

Aus dem Sonderforschungsbereich "Embryonale Entwicklung
und Differenzierung (Embryonal-Pharmakologie)"

(Sprecher: Prof. Dr. med. H.-J. Merker)

an der Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ZUM PROBLEM FOLATMANGEL UND ENTWICKLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Dr.rer.nat.
vorgelegt dem
Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

von
Diplombiologe Richard Roetz
aus Magdeburg

1972
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553616_0032

Aus dem Sonderforschungsbereich "Embryonale Entwicklung
und Differenzierung (Embryonal-Pharmakologie)"

(Sprecher: Prof. Dr. med. H.-J. Merker)

an der Freien Universität Berlin

UNTERSUCHUNGEN ZUM PROBLEM FOLATMANGEL UND ENTWICKLUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines Dr.rer.nat.
vorgelegt dem
Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik
der Freien Universität Berlin

von

Diplombiologe Richard Roetz
aus Magdeburg

1. Referent: Prof. Dr. Ing. Ernst-Randolf Lochmann

2. Referent: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Merker

Tag der Promotion: 8. Dezember 1972



Gedruckt mit Genehmigung des Zentralinstitutes für
Biochemie und Biophysik der Freien Universität Berlin

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. H.-J. MERKER, bin ich für die Überlassung des Themas, sein stetes förderndes Interesse und mannigfache Hilfe und Beratung aufrichtig zu Dank verpflichtet.

Für Ratschläge bei der Abfassung des Manuskriptes und wertvolle Hinweise gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. E.-R. LOCHMANN, Herrn Prof. Dr. F. KÖRBER sowie Herrn Prof. Dr. J. NEVINNY-STICKEL, für Hinweise und Zusammenarbeit in der Methotrexat-Serie Frau Prof. Dr. E. KÖHLER.

Herrn Prof. I. CHANARIN, B.Sc., M.D., M.C. Path., sowie seinem Team (Dr. J. PERRY, Dr. K. ROWE, Mrs. J. STACEY und Mr. Th. HERD) am Northwick Park Hospital, Harrow-on-the-Hill, England, möchte ich für die Einweisung in die Folatbestimmungsmethodik und die mir gewährte gastfreundliche Aufnahme auch an dieser Stelle herzlich danken.

Für technische Mitarbeit bedanke ich mich bei Frl. B. MILLBERGER, die in den klinischen Serien die Blutentnahme und Gewinnung der Sera durchgeführt hat, bei Frl. H. PILZ, die bei den Tierversuchen mithalf sowie bei allen Mitarbeitern des II. Anatomischen Institutes, ohne die die elektronenmikroskopischen Aufnahmen nicht entstanden wären.

Für die Bereitstellung von Geräten und Büchern sowie für finanzielle Beihilfen danke ich herzlich dem medizinischen Leiter der Deutsche Abbott GmbH, Ingelheim/Rhein, Herrn Dr. med. E. O. WIETHOFF. Mein Dank gilt weiter der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die mir zuteilgewordene Förderung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 29 "Embryonale Entwicklung und Differenzierung (Embryonal-Pharmakologie)".

Gliederung

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	6
1.1. Physiologische Chemie der Folsäuregruppe	7
1.2. Ursachen und Parameter des Folatmangels	15
1.3. Folatmangel und Entwicklungsstörungen	21
1.4. Eigene Fragestellungen	32
2. Folatnachweisverfahren	34
2.1. Arten der Folatbestimmung in biologischem Material	34
2.2. Mikrobiologische Nachweisverfahren für Folsäurederivate	35
2.3. Folatbestimmung mit <i>Lactobacillus casei</i> NCIB 10463	37
2.3.1. Beschreibung des Verfahrens	37
2.3.2. Überprüfung des Verfahrens	41
3. Eigene Untersuchungen über Folatspiegel und Eisensättigung des Serums	53
3.1. Längsschnittstudie an schwangeren Frauen	53
3.2. Untersuchungen an trächtigen Ratten	54
3.3. Serumfolat unter kontrazeptiver Medikation	58
4. Zellveränderungen als Parameter eines Folatmangels	62
4.1. Hypersegmentierung von Leukozytenkernen	62
4.2. Methotrexateffekte an der Rattendecidua	64

	<u>Seite</u>
5. Diskussion	68
5.1. Veränderungen des Serumfolatspiegels in der Gravidität	68
5.2. Veränderungen des Serumfolatspiegels unter dem Einfluß von Kontrazeptiva	70
6. Zusammenfassung	72
7. Literaturverzeichnis	73
Anhang: Elektronenmikroskopische Abbildungen	108
Lebenslauf	118

1. Einleitung

In den Jahren 1945/46 wurde von ANGIER et al. aus Leber erstmals der Lactobacillus casei-Wachstumsfaktor F o l - s ä u r e (Pteroylglutaminsäure, PteGlu), ein aus den Strukturelementen Pterin, p-Aminobenzoesäure und Glutaminsäure (Formeln s. S. 8) zusammengesetztes Vitamin der B-Gruppe isoliert und durch Synthese bestätigt. Bereits früher (Literatur bei BLAKLEY 1969, CHANARIN 1969) waren bestimmte alimentäre Anämieformen auf das Fehlen dieses Vitamins zurückgeführt worden. Mit der chemischen Verfügbarkeit und der sofort anschließenden Synthese der ersten antagonistischen Derivate (Aminopterin und Amethopterin = Methotrexat) begann eine intensive biochemische und pharmakologische Forschung, die uns heute einen in den Hauptzügen geschlossenen Einblick in die Folsäure-Biosynthese, in die Stoffwechselfunktionen der Folsäure-Coenzyme beim vitamin-abhängigen Säugetierorganismus sowie in den biochemischen Wirkungsmechanismus der experimentell wie therapeutisch eingesetzten antagonistischen Strukturanaloga gestattet. Dieser Stand der Forschung wird dokumentiert in den umfangreichen Monographien von BLAKLEY (1969) und CHANARIN (1969), in einem von BERTINO (1971) herausgegebenen Symposiumbericht sowie in verschiedenen Übersichtsartikeln über Detailprobleme (z.B. Folsäurestoffwechsel: HUTNER et al. 1959; Chemie: SHIVE 1963; Biosynthese: SHIOTA 1971). Enzymchemische Aspekte von Folsäurederivaten und -antagonisten werden in der interessanten Monographie von SLAVIK & SLAVIKOVA (1971) ausführlicher behandelt.

Für Embryologen und Teratologen hat Folsäure als das "Vitamin der Reproduktion und Entwicklung" besonderes Interesse. Bereits aus dem Beginn der 50er Jahre liegen experimentelle (!) Beobachtungen am Menschen vor, die die Auslösung von Mißbildungen am Menschen nach Gabe von Aminopterin bestätigen. Damit sind, auch nach der Thalidomid-Katastrophe, Substanzen wie Aminopterin und Metho-

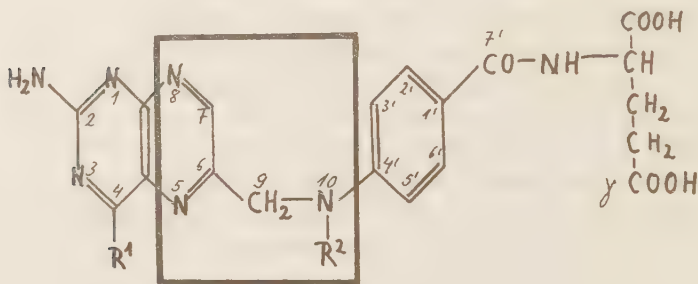
threoxat die bislang einzigen chemisch-definierten Substanzen mit bekanntem biochemischen Angriffspunkt, mit denen Mißbildungen sowohl beim Menschen als auch bei Versuchstieren erzeugt worden sind. Im Vergleich mit dem heutigen Stand der biochemischen Forschung sind die teratogenetischen Aspekte - trotz der relativ intensiven Bemühungen einiger Gruppen - kaum über das Stadium einer deskriptiven Bearbeitung gekommen und durch zahlreiche ungelöste Probleme gekennzeichnet. Im vergleichbaren Maß gilt dies auch für die Folsäurephysiologie, vor allem jedoch für den alimentären Folsäuremangel, seine Parameter und seine Bedeutung für den Menschen.

1.1. Physiologische Chemie der Folsäuregruppe

Die Folsäure der Nahrung liegt als Mono- oder Polyglutamat (BAUGH & KRUMDIECK 1971) vor, wobei in der gebundenen Form bis zu sechs weitere Glutaminsäuremoleküle mit der Gamma-Carboxylgruppe der PteGlu peptidartig verknüpft sind. Es wird angenommen, daß bei der Resorption des Nahrungsfolats^x im oberen Dünndarm (BAKER et al. 1968, 1969; BUTTERWORTH jr. 1968; MARKKANEN 1968; CHANARIN et al. 1958) als Conjugasen bezeichnete Enzyme der Dünndarmschleimhaut diese Peptidbindungen auftrennen und das resorbierte Folat vornehmlich PteGlu darstellt (BIRD et al. 1965; McLEAN et al. 1970; PERRY & CHANARIN 1968). Die Conjugasen haben vermutlich für die Regulation der Resorption und auch für die Bindung von Folat in den Geweben eine entscheidende Funktion (BERNSTEIN et al. 1970; KLIPSTEIN 1967; SANTINI et al. 1966), doch sind hier noch sehr viele Fragen offen. Im Gegensatz zu den koprophagen Tieren wie Ratte und Maus spielt die Folatbildung im Dickdarm (durch Darmbakterien, Resorption jedoch nur im Dünndarm)

^x Die Bezeichnung "Folat" dient im Text als Sammelbezeichnung für folsäure-aktive Verbindungen.

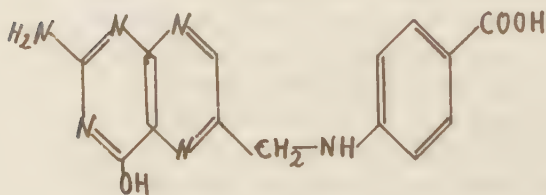
Formel der Folsäure und einiger wichtiger Antagonisten:



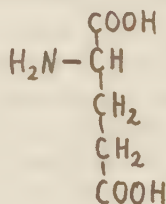
R^1	R^2	Verbindung:
-OH	-H	Pteroylglutaminsäure, <u>Folsäure</u> , PteGlu
-NH ₂	-H	4-Amino-PteGlu, Aminopterin
-NH ₂	-CH ₃	4-Amino-10-methyl-PteGlu, Methotrexat
-OH	-CH ₃	10-Methyl-PteGlu

(In der engl. Literatur werden oft als Abk. verwendet: PGA für PteGlu und MTX für Methotrexat)

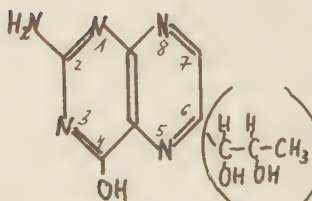
Elemente der Folsäure:



Pteroylsäure

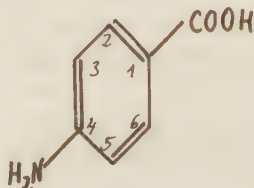


Glutaminsäure



Pterin

(Biopterin)



p-Aminobenzoessäure

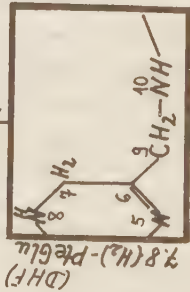
für die Folatversorgung des Menschen keine Rolle (HEPNER 1969; KLIPSTEIN & LIPTON 1970; KLIPSTEIN & SAMLOFF 1966). Auch im Blut und den Geweben liegt Folat (PteGlu und abgeleitete Coenzyme) teilweise an Protein (über Glutaminsäure ?) gebunden vor (CHANARIN et al. 1966; DOCTOR & COUCH 1953; MARKKANEN & PETTOLA 1970, 1971; METZ et al. 1968; NORONHA & SILVERMAN 1962; SIVA SANKAR et al. 1969), wie auch (vgl. BLAKLEY 1969) Versuche zur Folatbestimmung in Blut und Geweben vor und nach Einwirkung von Conjugasen gezeigt haben. Die Ausscheidung überschüssigen Nahrungsfolats erfolgt vorwiegend in den Faeces, nur wenig durch den Urin, und die mit Speichel und Galle sezernierten Folatmengen unterliegen im Darmtrakt der erneuten Resorption. Leider fehlen exakte quantitative Bilanzuntersuchungen sowohl bei Mensch wie Tier und die vereinzelt Versuche, z.B. mit radioaktiv markiertem Folat die Verteilung in den Geweben zu untersuchen (Literatur vgl. ROETZ & MERKER 1972), ermöglichen noch keine abgesicherten Aussagen. Der Folatbedarf eines erwachsenen gesunden Menschen wird auf ca. 0,2 mg resorbiertes Nahrungsfolat/Tag geschätzt.

Der größte Teil der im Blutserum vorhandenen Folate liegt als Monoglutamat vor, in Formen also, die ein Wachstum von *Lactobacillus casei* ermöglichen. Die stoffwechselaktive Substanz aller Folatcoenzyme ist die im nachfolgenden Schema, in dem die strukturellen Änderungen der Folate in dick umrandete Rechtecke eingezeichnet sind, dargestellte 5.6.7.8-(H₄)-PteGlu (Tetrahydrofolat), von der letztlich alle Wirkungen der Folsäure ausgehen. Auch die Zuordnung der einzelnen Coenzyme zu ihren Stoffwechselwirkungen ist im nachfolgenden Schema dargestellt, wobei die Beziehungen zum genetischen Informationsfluß hervorgehoben wurden. Der Folateigenstoffwechsel sowie seine Beziehung zum C₁-Stoffwechsel sind heute gut bekannt und in zahlreichen Übersichten zusammengestellt (z.B. HUTNER et al. 1959; JAENICKE & WILMANNS 1963; NYSTRÖM & NYSTRÖM 1967; SILBER & MANSOURI 1971; WELCH & NICHOL 1952; WILMANNS 1961, 1964;

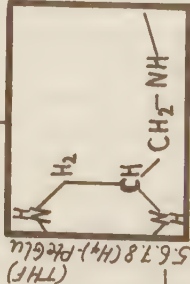
Folatstoffwechsel

Folatwirkungen im Intermediärstoffwechsel

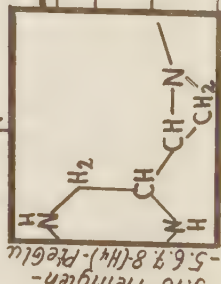
PteGlu.



(DHF)
7,8(H₂)-PteGlu

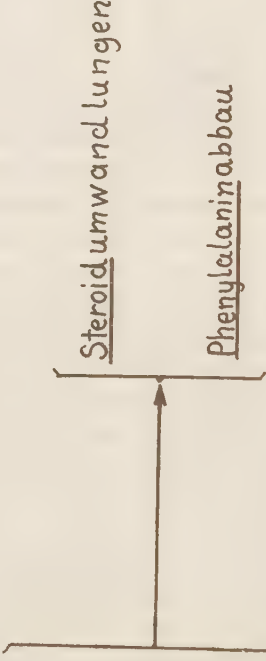


(THF)
5,6,7,8(H₂)-PteGlu



9,10-Methylen-
5,6,7,8(H₂)-PteGlu

Dihydrofolatreduktase



Steroidumwandlungen

Phenylalaninabbau

Thymidylat-
biosynthese

DNS

Genetischer
(central)

Glycinabbau

Serinab- u. -aufbau

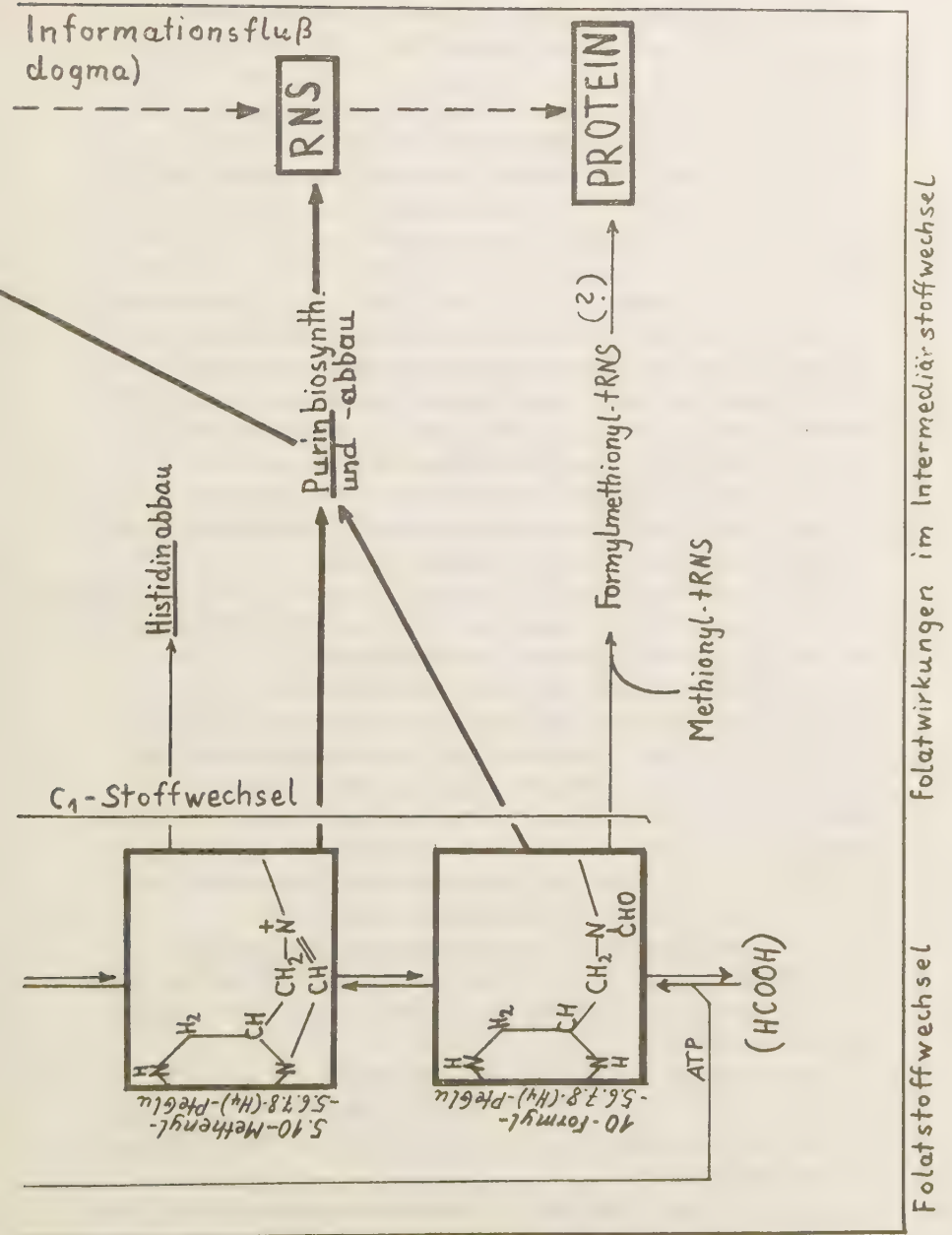
Betain
Sarkosin
Cholin

Phosphatide

Methioninbiosynthese

Vitamin B₁₂

C₁-Stoffwechsel



ZITTOUN & ZITTOUN 1972). Die folgenden Ausführungen sollen daher auch nur die im Schema nur angedeuteten Beziehungen verdeutlichen.

Die wichtigsten Reaktionen im Folateigenstoffwechsel sind:

1. die durch die Dihydrofolatreduktase (Folatreduktase, Tetrahydrofolatdehydrogenase, 5.6.7.8-(H₄)-PteGlu: NAD(P)-Oxidoreduktase EC 1.5.1.3) katalysierte Schlüsselreaktion der Aktivierung des biologisch unwirksamen Pteroylglutamats

$$\text{PteGlu} + 2 \text{ NADPH} + 2 \text{ H}^+ \rightleftharpoons 5.6.7.8\text{-(H}_4\text{)-PteGlu} + 2\text{NADP}^+;$$

2. eine auch nicht-enzymatisch mit Formaldehyd ablaufende Aufnahme einer C₁-Gruppe, wobei im Stoffwechselhauptweg diese Gruppe aus Serin oder Glycin, aber auch aus Betain, Sarkosin oder Cholin (vgl. WILLIAMS jr. et al. 1953) stammen kann, unter Bildung eines Methylenderivates:

$$5.6.7.8\text{-(H}_4\text{)-PteGlu} + (\text{HCHO}) \longrightarrow 5.10\text{-Methylen-THF};$$

3. die durch eine Dehydrogenase katalysierte Umsetzung des Methylen- in das Methenyl-Tetrahydrofolat:

$$5.10\text{-Methylen-THF} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons 5.10\text{-Methenyl-THF} + \text{NADPH} + \text{H}^+;$$

4. die durch eine Cyclohydrolase katalysierte Aufspaltung der Methenylbrücke zu einer N-Formylgruppe

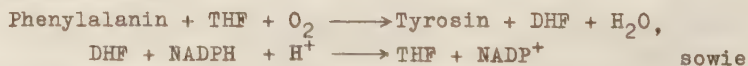
$$5.10\text{-Methenyl-THF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 10\text{-Formyl-THF} + \text{H}^+;$$

5. letztlich ein direkter, durch eine Synthetase katalysierter Zugang aus dem Tetrahydrofolat zum Formylderivat nach



Einige weitere Reaktionen sind Bestandteil des weiter unten besprochenen Aminosäurestoffwechsels. Bei Mikroorganismen und Folatbildnern sind weitere Reaktionen und auch Stoffwechselinterferenzen beschrieben worden.

Unter den Stoffwechselwirkungen der Folatcoenzyme fallen zwei Reaktionen aus dem C₁-Stoffwechsel heraus. Es sind dies
a) eine direkte Beteiligung des Tetrahydrofolats am Phenylalaninabbau nach



b) eine Beteiligung von reduzierter PteGlu an Steroidhydroxylierungen der Art

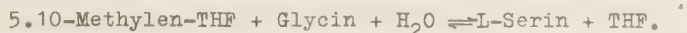


Die folatabhängigen Reaktionen des C₁-Stoffwechsels betreffen Biosynthese und Abbau einiger Aminosäuren (Reaktionen c bis f), Biosynthese und Abbau von Purinen (Reaktionen g und h) sowie die Biosynthese von Thymidylat (Reaktion i): c) eine oxidative Decarboxylierung nachfolgenden Typs ist als Weg des Glycinabbaus auch beim Warmblüter beschrieben worden:

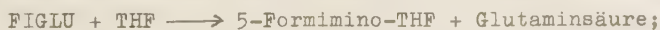


Diese Reaktion verläuft unter Beteiligung von Pyridoxal-phosphat.

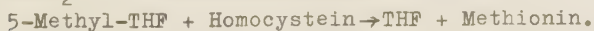
d) Die gegenseitige Umwandlung von Glycin und Serin durch die L-Serin: Tetrahydrofolat -10-Hydroxymethyltransferase (EC 2.1.2.1) ist weit verbreitet und folgt der Reaktion



e) Der Abbau des Histidins verläuft über Urocaninsäure, Imidazolnpropionsäure und Formiminoglutaminsäure (FIGLU) zur Glutaminsäure. Die letzte Reaktion dieser Reaktionskette erfolgt unter Beteiligung von Folat (vgl. TABOR & WYN-GARDEN 1959). Bei einem Folatmangel unterbleibt nach Histidinbelastung weitgehend der Abbau von FIGLU und das dann verstärkte Auftreten dieser Substanz im Urin gilt als Mangelparameter. Der FIGLU-Abbau verläuft nach

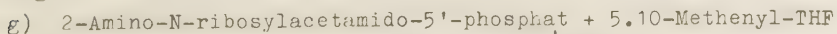


f) Die Biosynthese von Methionin verläuft unter gleichzeitiger Beteiligung von Folat und Vitamin B₁₂. Die cobamidhaltige 5-Methyltetrahydrofolat: Homocystein -Methyltransferase katalysiert die Reaktion

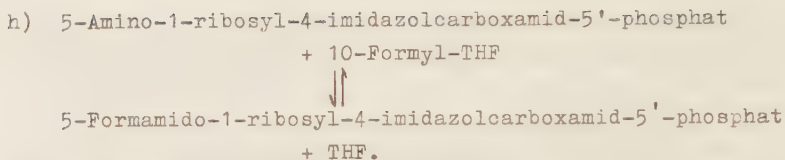


Der letzte Teil dieser Reaktion findet nur in Gegenwart von S-Adenosylmethionin und reduziertem Flavin statt. -

Die de novo-Synthese von Purinen enthält 11 verschiedene Schritte, an zwei dieser Teilreaktionen sind Folate beteiligt:

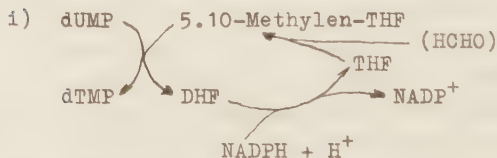


Diese Reaktion wird durch die 5.10-Methenyl-THF: 2-Amino-N-ribosylacetamido-5'-phosphat- Transformylase katalysiert.



Auch diese Reaktion wird durch eine spezifische Transformylase katalysiert. -

Einen intensiv untersuchten (PASTORE & FRIEDKIN 1962; WAHBA & FRIEDKIN 1962; SILBER 1963; WILMANN 1966; SILBER & MANSOURI 1971; DUNLAP et al. 1971; KALMAN 1971) sowie theoretisch, experimentell wie auch therapeutisch beeinflussbaren Zugang zur Steuerung der DNS-Synthese stellt der Reaktionszyklus der Thymidylatsynthetase dar, der sich unmittelbar an die Schlüsselreaktion des Folateigenstoffwechsels, die Katalyse der Dihydrofolatreduktase anschließt:



Nur durch diese Reaktion wird das für DNS charakteristische dTMP in der Zelle synthetisiert. Eine Blockierung dieser Reaktion, direkt oder durch vorgeschaltete Blockierung der Dihydrofolatreduktase, muß also eine DNS-Synthese unmöglich machen. Die Möglichkeiten zur pharmakologisch-biochemischen Beeinflussbarkeit sind von NEUBERT (1966) zusammengestellt. Wir werden diese Kette Folat → dTMP → DNS noch häufiger erwähnen müssen. -

j) Für die Initiierung der Proteinbiosynthese bei Bakterien erfolgt die Startreaktion unter Beteiligung eines Folatcoenzyms (HERMAN & ROSENSWEIG 1969; DICKERMAN & SMITH 1970):

Methionyl-tRNA + 10-Formyl-THF → Formylmethionyl-tRNA + THF.
 Es sind aber bis heute keine Beweise erbracht (DICKERMAN 1971), daß das Formylmethionyl-tRNA-Molekül auch bei Eukaryonten eine gleich große Bedeutung hat.

1.2. Ursachen und Parameter des Folatmangels

Ein Vitaminmangel kann entstehen als Folge

- a) einer unzureichenden Zufuhr mit der Nahrung;
- b) eines erhöhten Bedarfs;
- c) einer unzureichenden Ausnutzung einer sonst vollwertigen Nahrung.

Weiter können Vitaminmangelzustände induziert werden durch die therapeutische Anwendung von Vitaminantagonisten, zu- meist strukturähnlichen Verbindungen, die am Umsatz- oder Wirkort das Vitamin verdrängen. Alle diese Möglichkeiten sind auch für die Entstehung eines Folatmangels^{*} bekannt (HERBERT 1964).

In der nachfolgenden Zusammenstellung (n. ROETZ & MERKER 1972) sind die bislang bekannten Ursachen eines Folatman- gels aufgegliedert:

Nahrungsfolat ungenügend	Erhöhter Be- darf	Pharmakainterfe- renzen
- Mangelernährung - ungenügende Nah- rungsaufnahme - Verluste bei Zu- bereitung und Kon- servierung der Nahrung - Resorptionsstö- rungen	- Schwanger- schaft - Geburt, Lakta- tion - Wachstum - generalisierte maligne Tumoren - hämolytische Anämien - chronische In- fekte	- cytostatische Antifolate - Antimalariamit- tel - Tuberkulostatika - Antiepileptika - Kontrazeptiva (?)

```
graph TD; A[Nahrungsfolat ungenügend] --> D[FOLATMANGEL]; B[Erhöhter Bedarf] --> D; C[Pharmakainterferenzen] --> D;
```

Experimentelle Arbeiten über einen alimentären Folatmangel liegen nur in sehr geringer Zahl vor. HERBERT (1962) hat in einem langfristigen Versuch einer gesunden Versuchsperson eine Tagesdosis von nur 5 ng Folat zugeführt. Folgende Symptome, die auch heute noch als Parameter eines klinischen Folatmangels

* Der Begriff Folatmangel gilt nur für Substanzen des Typs PteGlu; bei einem klinisch-manifesten Folatmangel können z.B. die Blut- und Gewebespiegel des sehr ähnlichen Biop- terin normal oder erhöht sein (FLEMING & BROQUIST 1967).

dienen, haben sich bis zum Abbruch des Versuchs entwickelt und wurden durch eine Folatsubstitution reversibilisiert:

nach ca. 2 Wochen	erniedrigtes Serumfolat
nach 6 - 10 Wochen	periphere Leukozyten mit hypersegmentierten Kernen
nach 12 - 18 Wochen	positiver FIGLU-Nachweis im Harn nach Belastung mit Histidin
nach 17 Wochen	reduziertes Erythrozytenfolat
nach 19 Wochen	megaloblastisches Knochenmark
nach 20 Wochen	makrozytäre Anämie.

Über den Einfluß verschiedener Diätformen auf die menschliche Folatbilanz haben bereits REGISTER & BARRETT (1953) berichtet. Werden Ratten (CHANARIN et al. 1969) folatfrei ernährt, so ist bereits nach nur einer Woche das Leberfolat, nach ca. 2 1/2 Wochen das Serumfolat und erst nach etwa 7 Wochen auch das Erythrozytenfolat auf etwa 50% des Ausgangswertes abgesunken. Diese Befunde von HERBERT und von CHANARIN weisen Veränderungen des Serumfolats einen unbestreitbaren diagnostischen Wert zu.

Ein Folatmangel (vgl. Editorial Brit. med. J. 1968, DAWSON & GARY 1971) durch ungenügende Ernährung ist in Westeuropa und Nordamerika vermutlich eher durch eine ungenügende Nahrungsaufnahme bedingt, bei alten Menschen (GIRDWOOD 1969; HURDLE & PICTON WILLIAMS 1966) allerdings oft auch in Verbindung mit einer unzureichend zusammengestellten Diät. Vor allem in Entwicklungsländern häufig ist neben einer besonders qualitativen Mangelerkennung die ungenügende Ausnutzung des Nahrungsfolats durch Resorptionsstörungen (Malabsorption, tropische/nicht-tropische Sprue, Gastroenteritiden: BAKER et al. 1968, BUTTERWORTH jr. 1968; FRIEDMAN et al. 1964; KLIPSTEIN 1967, 1968; MALDONADO 1969; SANTINI et al. 1966). Die Symptome dieser Folatresorptionsstörungen lassen sich durch eine Folatsubstitution oft schnell beseitigen (SHEEHY et al. 1961). Größere Verluste an Nahrungsfolat wurden experimentell bei der Zubereitung und Konservierung der Nahrung nachgewiesen (Literatur bei ROETZ & MERKER 1972) - diese Tatsache kann eines Tages auch für unsere Ernährung Bedeutung erlangen.

Von wesentlicherer Bedeutung ist jedoch ein erhöhter Folatbedarf unter bestimmten physiologischen oder pathologischen Bedingungen. Vornehmlich in der Schwangerschaft, die seit je durch ein verstärktes Auftreten von Anämien gekennzeichnet ist, wird für das Wachstum von Embryo, Plazenta und Uterus ein zusätzlicher Folattagesbedarf von etwa 0,2 mg resorbierte PteGlu neben einer sonst normalen Versorgung benötigt (CHANARIN 1969). Bei einem relativ hohen Anteil der untersuchten Frauen, meist zwischen 20 und 40%, werden von praktisch allen Untersuchern in der Schwangerschaft absinkende Serumfolatspiegel unter 3 - 5 ng/ml oder abnorme FIGLU-Exkretion nach Histidinbelastung festgestellt. Zusammenhänge zwischen Schwangerschaftsanämien bzw. Entwicklungsstörungen und Folatmangel haben ein über die ganze Welt verbreitetes Interesse gefunden (BAKER et al. 1957; CANTLIE et al. 1971; CHAN 1967; CHANARIN et al. 1968; COOPER et al. 1970; C.GILES 1966; HIBBARD 1967; HIBBARD & HIBBARD 1968; IYENGAR 1971; KHAN et al. 1968; KITAY 1969; KITAY & BUDDWENTZ 1969; KITAY et al. 1969; LINDHE 1967; LOWENSTEIN et al. 1966; McLEAN et al. 1970; RAE & ROBB 1970; RAURAMO et al. 1967; ROTHMAN 1970; SJÖVALL et al. 1967; STONE et al. 1967; WILLOUGHBY 1967; WILLOUGHBY & JEWELL 1966, 1968). Bei Durchsicht der Literatur fällt auf, daß in Deutschland diesem Problem fast keine Beachtung geschenkt wurde. GÖLTNER (1971) sowie ROETZ & MERKER (1972) haben anscheinend erstmals auf das Problem Folatmangel und Gravidität verwiesen und auch erste Untersuchungen hierzu (GÖLTNER et al. 1972; ROETZ & HAMPEL 1972) vorgelegt.

Die zumeist mit fortdauernder Schwangerschaft weiter absinkenden Folatspiegel erfahren oft eine zusätzliche Abnahme durch Geburt und Stillperiode (BAKER et al. 1958, 1960; MARKKANEN et al. 1969; METZ 1970; LANDON & OXLEY 1971).

Auch bei chronischen Infekten (ROBERTS et al. 1966), bei chronischen Lebererkrankungen (KLIPSTEIN & LINDENBAUM 1965) sowie bei Alkoholikern (CHANARIN 1969) wird erniedrigtes Serumfolat gemessen. Umschriebene Tumoren sind ohne Einfluß auf die Serumfolatkonzentrationen, während Abnahmen bei myeloproliferativen Erkrankungen (HOFFBRAND et al.

1966; CHANARIN 1970) sowie auch bei hämolytischen Krisen (IZAK et al. 1966, 1969) mehrfach beobachtet worden sind. Zusammenhänge werden auch zwischen Folat- und Eisenmangel (VELEZ et al. 1966) sowie zwischen Folat- und Vitamin B₁₂-Mangel beschrieben.

Durch die Verknüpfung von Dihydrofolatreduktase und Thymidylatsynthetase zur DNS-Biosynthese bestehen engste Verknüpfungen zwischen Folat und Wachstum (Zellvermehrung). Der Mehrverbrauch in der Gravidität wird auf die verstärkten Wachstumsprozesse zurückgeführt. Auch beim postnatalen kindlichen Wachstum ist der Folatverbrauch verstärkt (BURGIO & SEVERI 1971; FORD et al. 1972). Gleiches gilt für das tierische Wachstum (PteGlu + Glycin: MARVIN et al. 1950), für zelluläres Wachstum (DAS & HOFFBRAND 1969, 1970) und anscheinend auch für experimentelle Impftumoren, die bei höher dosiertem Folatangebot eine Wachstumsverstärkung zeigten (OLESON & LITTLE 1949). Andererseits können Tumoren durch einen in vitro-Folalentzug (nicht durch Antagonisten !) im Wachstum gehemmt werden (BERTINO et al. 1971). In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß nach gerade noch sublethalen Dosen (ca. 500 mg PteGlu/kg Körpergewicht) nach einer temporären Nierenfunktionsstörung eine starke Regenerationsphase der Nierentubuli mit einer verstärkten Neusynthese von DNS und Protein folgt (TAYLOR & CARMICHAEL 1949; BASERGA et al. 1968; THRELFALL et al. 1966; BRADE et al. 1968, 1969, 1970; PAUL et al. 1969).

Wegen ihrer cytostatischen Wirkung (GIRDWOOD 1960; BERTINO 1963, 1971; WERKHEISER 1963, 1965; NICHOL 1963; WOOLLEY 1963) sind die eigentlichen Antifolate Aminopterin und Methotrexat eingehend untersucht worden. Beide Substanzen hemmen pseudo-irreversibel die Dihydrofolatreduktase in Konzentrationen um 10^{-8} - 10^{-9} molar. Ihrer Anwendung sind Grenzen gesetzt durch die Ausbildung resistenter Zellstämme sowie durch ihre Zytotoxizität gegenüber allen proliferierenden Geweben (Mitosehemmung s. z.B. GELFANT 1968; PRENSKY & HUGHES 1970), besonders gegenüber

blutbildenden Geweben (TERENTEVA & FEINSHTEIN 1958; CON-DIT et al. 1960; REIZENSTEIN 1960), lymphatischem Gewebe (DOUGHERTY & DOUGHERTY 1950) und der stark regenerierenden Darmschleimhaut (MILLINGTON et al. 1962; OKAMOTO 1963; MAR-GOLIS et al. 1971). Die durch die Hemmung der Dihydrofolat-reduktase (NICHOL & WELCH 1950) mit Antifolaten resultie-renden histologischen Veränderungen (BANERJEE & DRAVID 1959) sind nur ungenügend untersucht und beschrieben wor-den und submikroskopische Strukturanalysen nach alimentä-rem Folatmangel oder nach Antifolaten sind bis heute nicht publiziert worden. Wie ein Mangel an Nahrungsfolat kann auch Aminopterin eine experimentelle Megaloblastenanämie produzieren (WILSON et al. 1949). Die Antifolate haben ferner immunsuppressive Wirkung.

Reduzierte Serumfolatspiegel werden weiter beschrieben nach Antiepileptika wie Diphenylhydantoin oder Primidon (KLIPSTEIN 1964; CHILD et al. 1969), Tuberkulostatika wie Cycloserin (KLIPSTEIN 1967), Antimalariamittel wie Chlor-guanidin (GREENBERG 1949) oder Pyrimethamin (SCHMIDT & SCHMIDT 1956; WOOD & HITCHINGS 1959), Sulfonamide (DIE-TRICH et al. 1950; JUKES & BROQUIST 1963) sowie das jetzt viel diskutierte und applizierte antibakterielle Trime-thoprim (GHILCHIK et al. 1970; JENKINS et al. 1971; KAR-LIN & LEVRAT 1972). Von diesen Substanzen sind Pyrimetha-min und Trimethoprim als echte Antifolate bekannt.

Der erhöhte Bedarf an Folat in der Schwangerschaft könnte nicht nur Folge erhöhten Bedarfs für die besonderen Wachs-tumsprozesse sein. Denkbar wäre auch eine unter der hormo-nalen Umstellung der Schwangerschaft veränderte Resorp-tion, die an den Conjugasen ansetzen könnte. Dieser An-sicht ist eine Gruppe um STREIFF. Bei einer Langzeitappli-kation hormonaler Kontrazeptiva wären dann gleichfalls ver-stärkt reduzierte Serumfolatspiegel zu erwarten. Die ersten klinischen Untersuchungen hierzu liegen seit 1968 vor. Es fällt auf, daß bis auf McLEAN et al. (1969), die sich an-hand ihres Materials nicht entscheiden können, eine Gruppe

(BUHAC & FINN 1971; LUHBY et al. 1971; PATON 1969; RYSER et al. 1971; SHOJANIA et al. 1968, 1969; STREIFF 1970; TOYHILL & SMITH 1971), oftmals allerdings nur mit einzelnen Kasuistiken, einen Zusammenhang zwischen Kontrazeption und verstärkt auftretenden niedrigen Serumfolatspiegeln oder positiven FIGLU-Tests bejaht, während andere Autoren (PRITCHARD et al. 1971; SPRAY 1968; STEPHENS et al. 1972) derartige Zusammenhänge nicht finden oder nicht für möglich halten. Das Problem ist also noch offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Ein klinisch-manifester Folatmangel wird durch die Megaloblastenanämie ausgewiesen, bei der unreife Erythroblasten mit riesigen Kernen aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden. In diesen Zellen wurden Chromosomenveränderungen (BOTTURA & COUTINHO 1967) bzw. Chromatinanomalien (KASS 1968) sowie veränderte Enzymaktivitäten (STUART & SKOWRON 1968) beschrieben. Eine Megaloblastenanämie tritt in der Schwangerschaft gehäuft auf (CHANARIN 1969; GILES 1966; KHAN et al. 1968; LOWENSTEIN et al. 1966; PALVA & SALOKANNEL 1972; RAE & ROBB 1970; SHEEHY et al. 1961; SPEC-TOR & METZ 1966; WOODRUFF 1961) und stellt in manchen Ländern ein ernstes Gesundheitsproblem (HERBERT 1968) dar.

Wichtiger als die klinisch-manifeste Megaloblastenanämie ist jedoch das Erkennen des sogenannten präklinischen Folatmangels (HANSEN 1967; HERBERT 1967). Dieser Zustand ist gekennzeichnet durch Serumfolatwerte unter 3 ng/ml, positiven FIGLU-Nachweis im Harn (Methode z.B. von HLA-PE & BATU 1967) nach oraler Histidinbelastung (LUHBY et al. 1959; HIBBARD 1967) und das Auftreten peripherer Leukozyten mit hypersegmentierten Zellkernen (KITAY et al. 1969; SIDDIQUI et al. 1970; HIBBARD & HIBBARD 1971). Zellkernveränderungen bei Folatmangel wurden übrigens auch von VAN NIEKERK (1966), KITAY & BUDDWENTZ (1969) und KLAUS (1971) an der Cervix uteri sowie an der ¹attendecidua nach Methotrexat (ROETZ et al. 1972) beschrieben. Da positive FIGLU-Tests allein jedoch nicht beweisend sind für einen Folatmangel, sie kommen auch bei Vitamin B₁₂-

Stoffwechselstörungen vor (WILMANNS & BURGMANN 1968), und da die hypersegmentierten Leukozyten erst relativ spät (vgl. S. 16) als Folatmangelsymptom auftreten, bleibt als bislang einziges Diagnostikum die Folatbestimmung im Serum. Die Einstellung einzelner Arbeitsgruppen zum diagnostischen Wert des herabgesetzten Serumfolats schwankt beträchtlich, doch führen Serumfolatspiegel unter 3 ng/ml nach einiger Zeit mit Sicherheit zur Megaloblastenanämie. Da in fast allen Untersuchungen Symptome des präklinischen Folatmangels bei etwa 1/5 aller schwangeren Frauen festgestellt wurden, Folate für Wachstum und Entwicklungsprozesse essentiell sind und durch Antagonisten Mißbildungen bei Mensch und Tier erzeugt werden, sollte eine Routinebestimmung des Serumfolats in das Programm einer Schwangerschaftsbetreuung aufgenommen werden oder aber häufiger an eine Folatsubstitution gedacht werden.

1.3. Folatmangel und Entwicklungsstörungen

Nach den ersten Veröffentlichungen über die Entstehung von Mißbildungen durch einen induzierten Folatmangel (ASLING, HOGAN, NELSON, THIERSCH) begann, sieht man von älteren Phänotypversuchen LANDAUERS mit Insulin ab, die erste experimentelle Phase der Teratologie. Beobachtungen mit Aminopterin und Methotrexat, die als Abortiva in Mode kamen, beim Menschen sowie experimentelle Untersuchungen an Ratten (Tabellen 1 und 2, nachfolgende Seiten) spiegeln einen Ausschnitt aus den intensiven Bemühungen einiger Arbeitsgruppen wieder. Andere Objekte bei Versuchen mit x(9,10)-Methyl-PteGlu waren Katzen (TUCHMANN-DUPLESSIS & LEFEBVRES-BOISSILOT 1957) und Mäuse (TUCHMANN-DUPLESSIS & MERCIER-PAROT 1957; RUNNER 1959), in Versuchen mit Methotrexat Rhesusaffen (WILSON 1961) sowie verschiedene andere Versuchstiere (Literatur bei ROETZ & MERKER 1972). Aus einem Vergleich der Wirkungen verschiedener Antifolate kann man schließen, daß die "härteren" Verbindungen Aminopterin und

Tabelle 1: Folatantagonisten und menschliche Schwangerschaft
(Literaturübersicht)

Autoren:	Substanz Dosis Fallzahl	Applikation (Tage nach letz- ter Menstruat.)	Wirkungen:
GOETSCH ('62)	Aminopterin 2 mg/12 Std., zus. 12 mg n = 11	34 - 65	abortiv; Nebenwirk.*
	n = 4 12 mg (3x), 16 mg (1x), 29 mg (1x) n = 5	45 - 69	abortiv; Nebenwirk.+++
		45 - 72	keine Aborte; norm. Plazenta, 1x schwere Mißbildungen
EMERSON ('62)	Aminopterin 29 mg n = 1	45 - 56	reduz. Wachstum, Hy- poplasie von Unterkie- fer, Gehirn; Hydroce- phalus, Fehlen von Parietalknochen, hin- tere Gaumenspalte, mißbild. Ohren
MELTZER ('56)	Aminopterin 20 mg n = 1	? (mehrere Wochen)	reduz. Gewicht, Schä- delmißb., Spaltfuß
WARKANY et al. ('59)	Aminopterin 12 mg n = 1	63 - 70	schwere Mißbild.: reduz. Wachstum, kra- niale Dysostosen, hin- tere Gaumenspalte, Kieferhypoplasie, Ohr- mißbildungen
THIERSCH ('52)	Aminopterin 6 - 12 mg + (3x) 11 - 12 mg n = 12	22 - 54	10x Aborte; 3 ältere Embryonen mit Hydro- cephalus, Meningoen- cephalocoele, Gaumen- spalte u. Hasenschar- te; jüngere Embryonen mit Nekrosen in Leber, Nebennieren, Darm; reduz. Blutbildung
THIERSCH ('56)	Aminopterin n = 1	28 - 42	Anencephalus

Tabelle 1: Fortsetzung

SHAW & STEINBUCH (1968)	Aminopterin n = 1	56	reduz. Körpergröße, Schädelmißbildungen
MILUNSKY et al. ('68)	Methotrexat n = 1	?	Dextrokardie, Oxycephalie, abnorme äußere Ohren, Hypertelorismus, Micrognathie, Affenfurche, nur eine Zehe

Tabelle 2: Auswirkungen eines induzierten Folatmangels auf die Entwicklung von Rattenembryonen (Bei Methode = "Diät" erhalten die ♀♀ mit dem Futter 1% Sulfasuccinylthiazol[±] + 0,28 - 0,5 Gew.-% x-Methyl-PteGlu)

Mißbildungen:	Frequenz:	Methode:	Autoren:
Hydrocephalus	bis 25 %	1-2 mg x-Methyl- PteGlu, bis zu 158 Tage	HOGAN et al. (1950)
Hydrocephalus	7,5% (n=1604) 0,2% (n=1254)	niedr. Folatdiät + Folat	RICHARDSON (1951)
Hydrocephalus durch Ventrikelstenosen	bis 20%	Diät	OVERHOLSER et.al. (1950, 1954)
Hydrocephalus durch Stenosen	bis ca. 10%	Diät + 9-Methyl- PteGlu	STEMPAK (1966)
Resorptionen	100% (d 7/9, 8/10) 61% (d 9/11)	Diät, mit PteGlu unterbro- chen	NELSON et al. (1956)(1950), (1952),(1955)
Mißbildungen	15% (d 8/9,5) 34% (d 9/11) 62% (d 10/12)		

zur Teratogenität von Sulfonamiden vgl. z.B. PAGET & THORPE (1964)

Tabelle 2: Fortsetzung

Augen (Linse, Retina)		Diät	ARMSTRONG & MONIE (1966)
reduziertes Wachstum, Ossifikationsstörungen, Skelettmißbildungen, Syn- u. Polydaktylien, Gaumenspalten, mißbild. Lungen und Nieren, Hemmungsmißb. verschiedener Art, z.T. stadienabhängig	bis zu 100%	Diät	EVANS et al. (1951)
Skelett: 100% Rippen, ca. 80% Ulna, Radius, ca. 50% Scapula, Sterne- brum, Tibia, Syndaktylien hinten, wenig Becken	ab d 10 stärker als ab d 11	Diät	ASLING et al. (1955), ASLING & NELSON (1950)
Gaumenspalten	bis 90%	Diät	ASLING et al. (1955, 1960)
Herz- und Gefäßmißbild. verschiedener Art (Septumdefekte, pers. Truncus arteriosus, Gefäßverdoppelungen, veränderte Gefäßabgänge)	bis zu 55% (d 9/11)	Diät	BAIRD et al. (1954)
Kiemenbogenarterien u. Lungenvenen	maximal bei Applik. d 9/11	Diät	MONIE et al. (1955, 1956, 1957)
Hypoplasien von Nieren und Ureter u.a.	bis zu 66% (bei Applik. ab d 11 oder d 10/13)	Diät	MONIE et al. (1954, 1957)
verminderte Lernleistung der Nachkommen		vgl. HO- GAN et al.	WHITLEY et al. (1951)
Augen, Gesichtsschädel, Hirn, Hernien, Ödeme; Hydrocephalus, Exencephalus		Diät	GIROUD et al. (1952), GIROUD & BOISSELOT (1951)

Tabelle 2: Fortsetzung

Resorptionen	hochfrequent	Aminopte-	MURPHY & KARNOFSKY
	d 9/11	rin, 0,2	(1956 - zit. nach
Mißbildungen	15% (d 11)	mg/kg KG	SOKAL & LESSMAN,
		(d 7-13)	1960)
ohne Wirkung	Applik.: d 1/4	Aminopte-	BARANOV (1965)
dosis- und tagabhängig	d 5/13	rin, 0,05	
maxim. Schädigung	d 7/10	bis 0,2	
abnehmende Schäden	ab d 13	mg/kg KG	
Resorptionen und	hochfrequent	Aminopte-	THIERSCH & PHILIPS
Embryotoxizität		rin, 3x	(1950)
		0,1 mg	
		bzw. 0,15	
		mg/kg KG	
		(d 5/7	
		bzw. 7/8)	
Resorptionen	64%	Methotre-	WILSON (1971)
Mißbildungen	30%	xat (0,2	
		mg/kg KG,	
		d 9)	
Ossifikationsstörun-		letale	BERRY (1971)
gen (über gehemmte		Methotre-	
DNS-Synthese)		xat-Dosis	
		d 18, mit	
		hoher Do-	
		sis Tetra-	
		hydrofolat	
		aufgeho-	
		ben	

Methotrexat stärker embryotoxisch/embryoletal als terato-
gen wirken. Zusammenfassungen über die Beziehungen zwischen
Vitaminmangelzuständen bzw. cytostatischen Substanzen und
Mißbildungen bei Mensch und Tier finden sich bei NELSON
(1957), SOKAL & LESSMAN (1960), WERTHEMANN (1963), JOHNSON
(1965), KAITER (1965), KARNOFSKY (1965), GONTZEA (1969)
sowie TUCHMANN-DUPLESSIS (1969).

Es fällt auf, daß bis heute nur wenige Einzelarbeiten und gar keine systematischen Untersuchungen über Stoffwechselwirkungen von Antifolaten in embryonalen Geweben oder über zelluläre und subzelluläre Formänderungen nach Applikation von Folatantagonisten vorliegen.

Mit 9-Methyl-PteGlu, das trächtigen Ratten am 8. - 10. Tag der Schwangerschaft appliziert wurde, sehen JOHNSON (1964), JOHNSON & SCHULTZ (1971) sowie JOHNSON et al. (1963) bei stärkeren Effekten an Embryonen als an den Plazenten eine Hemmung der Proteinbiosynthese, kenntlich an der Abnahme der histochemisch nachgewiesenen RNS und an um 2/3 reduzierten Ribosomenzahlen, daneben weiterhin eine veränderte Kompartimentierung von Malatdehydrogenase, alkalischer und saurer Phosphatase. NETZLOFF (1967) und NETZLOFF & KAPLAN (1969) finden die biologische Oxidation von 13 Tage alten Rattenembryo-Dottersack-Präparaten und auch von dissoziierten Embryonalzellen erhöht, wenn den Muttertieren zwischen Tag 10 und 12 der Trächtigkeit 9-Methyl-PteGlu appliziert wurde. An kultivierten Augengeweben von Rattenembryonen bewirkt 9-Methyl-PteGlu eine Entwicklungsverzögerung, die durch PteGlu aufgehoben wird und sogar eine überschießende Reaktion erzeugen kann, was ARMSTRONG & ELIAS (1968) auch im Embryo als Erklärung für einige Mißbildungstypen annehmen möchten.

Methotrexat zerstört Trophoblastengewebe (KOIDE et al. (1971), und DANIELS sieht an neuroretinalen Explantaten von Hühnerembryonen eine Blockierung der DNS-Synthese und der Mitosen. Methotrexat und Aminopterin hemmen im Gegensatz zur unwirksamen 10-Methyl-PteGlu die Extremitätenregeneration bei Amblystoma und führen daneben auch zur Regeneration mißbildeter Extremitäten (GEBHARDT & FABER 1966) - diese Veränderungen werden mit Applikation von Tetrahydrofolsäure unterdrückt, während sich Thymidin als wirkungslos erweist. O'DELL & MCKENZIE (1963) beobachten dagegen an explantierten Hühnerembryonen mit Aminopterin Schädigungen der DNS-Biosynthese, die sie partiell mit Thymidin oder auch fremder DNS aufheben können. Mißbildungen an Hühnerembryonen mit Aminopterin wurden von KARNOFSKY et al. (1949) und von POCHKOV (1967) beschrie-

ben, letzterer fand 5-Fluoruracil gleich wirksam. An explantierten Hühnerembryonen werden mit Aminopterin induzierte Veränderungen durch Hypoxanthin und Thymidin (NABER et al. 1952), Hypoxanthinribosid und Desoxythymidin (SNELL & CRAVENS 1950) oder durch Tetrahydrofolat (CRAVENS & SNELL 1960) weitgehend vermieden; diese Autoren sehen die Aminopterinwirkung als durch Thymidinmangel (und Purinmangel) bewirkte Hemmung der DNS-Biosynthese in teilungsaktiven Geweben an.

In den letzten Jahren hat sich eine Diskussion um die Teratogenität von Antiepileptika (JANZ & FUCHS 1964; BIRD 1969) entwickelt, von denen bekannt ist, daß sie den Serumfolatspiegel senken und von denen inzwischen auch bereits einige experimentelle teratologische Arbeiten vorliegen. Auch eine Verbindung zwischen Folaten und Thalidomid wurde diskutiert. NYSTRÖM (1963) nimmt eine besondere Folatabhängigkeit des Trophoblasten und der Gewebe des Reproduktionstraktes an und hält hier Interferenzen mit Thalidomid für möglich. ECKERT & DÖRR (1971) konnten kürzlich über die Bildung eines stabilen Komplexes zwischen PteGlu und einem Thalidomidmetaboliten in wasserfreiem Dioxan berichten - sie halten auch in vivo-Interferenzen für denkbar. Auch die Teratogenität anderer Substanzen läßt sich durch Folatgaben experimentell reduzieren (RUNNER 1965). PEER et al. (1958) konnten mit PteGlu die durch Cortison induzierten Gaumenspalten bei Mäusen deutlich vermindern. In einer Arbeit wird jedoch PteGlu selbst als Teratogen beschrieben. NOTO (1967) sah nach Applikation von 3 mg kristalliner Folsäure/Ei Störungen in der Neuralrohrbildung des Hühnchens. Diese Beobachtung stellt mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch einen unspezifischen Effekt der kristallinen Säure dar.

Die regenerierende Rattenleber ist ein beliebtes Objekt zur Untersuchung von Wachstumseffekten. Mit der nach der partiellen Hepatektomie einsetzenden Mitosewelle ("Regeneration") sollte eigentlich die Aktivität der Dihydrofolatreduktase ansteigen. MALEY & MALEY (1960) finden z.B.

das Anschlußenzym Thymidylatsynthetase (und das Zuliefererenzym Desoxycytidylatdesaminase) in der regenerierenden Rattenleber erhöht. NGU et al. (1964) können jedoch für die Dihydrofolatreduktase keinen Anstieg feststellen, obgleich das Enzym z.B. durch Methotrexat gehemmt war. Auch MESCHAN & CASTELLS (1969) sehen mit Methotrexat oder Aminopterin nur eine sehr geringe Hemmung der Mitosen in der regenerierenden Rattenleber. Man muß jedoch vor Folgerungen aus diesen und ähnlichen anderen Befunden warnen. Diese Regeneration findet nämlich in situ, d.h. in einem ansonsten intakten Organismus statt, in Blut-durchströmten Geweben, mit vermutlich ausreichenden Blutspiegeln an allen Folaten. So besagt dann auch an diesem Modell die Wirkungslosigkeit der Antifolate oder ein Ausbleiben von Aktivitätsanstiegen der Dihydrofolatreduktase sehr wenig.

Auch über den Folateigenstoffwechsel embryonaler Gewebe existieren bislang nur Einzelarbeiten (vgl. BLAKLEY 1969). DOCTOR & GONZALES (1957) messen die Aktivität der Umwandlung $\text{PteGlu} \rightleftharpoons 5.6.7.8-(\text{H}_4)\text{-PteGlu}$ im Hühnerembryo. An Homogenaten aus ganzen Embryonen sehen sie Maxima am Tag 2,5 und 6,5 sowie Minima am Tag 4 und Tag 11, an der embryonalen Leber Maxima an Tag 13 und 16 und Minima an Tag 15 und 21. Die Bedeutung dieser Aktivitätswellen ist unbekannt. Verschiedene Enzyme des Folateigenstoffwechsels im Hühnerembryo haben nach SILBER et al. (1962) untereinander konstante Aktivitätsproportionen mit einem gemeinsamen absoluten Maximum zwischen dem 11. - 13. Entwicklungstag. Aminopterin hemmt hier die Dihydrofolatreduktase nur bei Messung mit niedrigen pH-Werten; Anzeichen für Isoenzyme lagen nicht vor. Nach ROBERTS & HALL (1965) ist ganz allgemein bei verschiedenen Tierarten die Aktivität der Dihydrofolatreduktase in embryonalen Geweben höher als in den entsprechenden Geweben adulter Tiere.

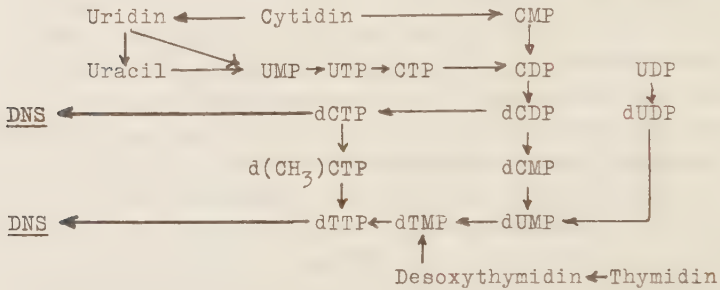
Sehr widersprüchliche Befunde und Meinungen kennzeichnen auch die Untersuchungen über Folate, Folatantagonisten und DNS-Vermehrung auf zellulärem Niveau. Methotrexat und Aminopterin werden in Zellkulturen ganz allgemein als potente Zellteilungsgifte (EAGLE & FOLEY 1956; SMITH et al. 1963) angesehen. Möglicherweise werden sich aber später viele

widersprüchliche Beobachtungen als Objekteigentümlichkeiten erklären lassen. SILBER et al. (1963) messen erhöhte Aktivitäten der Thymidylatsynthetase und der Desoxycytidylatsynthetase in leukämischen Leukozyten und JACOBSON (1964) nimmt sogar grundsätzliche Unterschiede im Pteridinstoffwechsel zwischen normalen und maligne entarteten Zellen an. HOOGSTRATEN et al. (1961) leiten sogar aus den bei ausgedehnten neoplastischen Bluterkrankungen z.T. erniedrigten Serumfolatspiegeln therapeutische Konsequenzen ab. REIZENSTEIN (1960) mißt im Knochenmark nach Aminopterin verminderten DNS-Gehalt. WESTERGAARD & PEARLMAN (1969) erreichen bei Tetrahymena mit Methotrexat + Uridin einen totalen Zellteilungsstop, der durch Thymidin aufgehoben werden kann. LOMAKINA et al. (1967) finden Aminopterin mit Fluordesoxyuridin zur Synchronisierung von Gewebekulturen geeignet. STEFFEN & STOLZMANN (1969) erreichen eine Synchronisierung von Lymphozytenkulturen mit Methotrexat + Adenosin oder Fluordesoxyuridin + Thymidin. VILLADSEN & ZEUTHEN (1970) bewirken mit Methotrexat + Uridin bei Tetrahymena eine Hemmung von Zellteilung und DNS-Synthese. ADAMS (1969) nimmt an, daß bei Einwirkung von Aminopterin zunächst ein Verbrauch des endogenen Thymidins erfolgt und bei aufgehobener Hemmung die DNS-Synthese vermindert anläuft, bis die endogenen Thymidinpools aufgefüllt sind. HOFFMAN (1970) konnte nach Fluordesoxyuridin gestoppte Mitosen mit Thymidin wieder in Gang setzen. RUECKERT & MÜLLER (1960) nehmen an, daß bei induziertem Thymidinmangel die Bildung anderer Zellebestandteile als der DNS weiter erfolgt und bei erneutem Zusatz von Thymidin ein unbalanziertes Wachstum (= Malignisierung) möglich machen. WILMANN (1966) nimmt für Aktivitätsveränderungen der Dihydrofolatreduktase und der Thymidylatsynthetase eher das Auftreten von Resistenzentwicklungen und induktorschen Aktivitätsanstiegen (Neusynthesen) durch Wegfall von Feedback-Hemmungen auf Nukleotidniveau an.

Umstehende Abbildung (aus VILLADSEN & ZEUTHEN 1970) ist eine typische biochemische Konstruktion. Sie gibt die bisher bekannten Möglichkeiten der Pyrimidinnukleotidsynthese (ohne Rückkoppelungen oder Aktivierungen) wieder,

Abbildung 1: Pyrimidinnukleotidbiosynthese

(aus VILLADSEN & ZEUTHEN 1970, leicht verändert)



erlaubt aber solange keine Aussagen über die Realität dieser Reaktionen, solange nicht experimentelle Beweise für den tatsächlichen Ablauf z.B. der Querverbindung von dCTP nach dTTP, die die durch Dihydrofolatreduktase gesteuerte Thymidylatsynthetase ($dUMP \rightarrow dTMP$) umgeht, vorliegen für das spezielle Gewebe oder die spezielle Zellart, die gerade zur Untersuchung ansteht. Selbst wenn diese Reaktionen qualitativ nachgewiesen sein sollten, so kann ihre Quantität in vivo absolut unzureichend sein. Widersprüchliche Befunde und Meinungen sind daher natürlicher Ausdruck unserer geringen Kenntnisse.

Mißbildungen sind bislang experimentell nie durch einen alimentären Folatmangel, sondern immer durch Folatantagonisten induziert worden. Eine Gruppe von Gynäkologen (PRITCHARD et al. 1969, 1971; SCOTT et al. 1970; WHALLEY et al. 1969, 1970) lehnt einen Zusammenhang zwischen Folatmangel, gemessen durch erniedrigtes Serumfolat oder positive FIGLU-Ausscheidung, und Schwangerschaftskomplikationen wie Mißbildungen, Abruption placentae, Hypertonie usw. grundsätzlich ab. Sie sind der Ansicht, daß der Embryo auf Kosten des mütterlichen Organismus Eisen und Folat auch dann noch in ausreichendem Maße bezieht, wenn die Mutter dadurch in eine Mangelsituation kommt. "The fetus

and placenta quite effectively parassitize folate and iron from the mother even when she is grossly deficient in these nutrients" (PRITCHARD et al. 1969). Demgegenüber stehen eine Vielzahl anderer Befunde. Läßt man die Untersuchungen über Folatmangel und Schwangerschaftsanämien außeracht, so finden HIBBARD (1967) und KITAY (1969) generell bei erniedrigtem Serumfolat oder positiver FIGLU-Exkretion die Frequenzen von Schwangerschaftskomplikationen erhöht. ALPERIN et al. (1969) finden bei Folatmangel die Frequenzen vorzeitiger Plazentaablösungen erhöht, MARTIN et al. (1965) die Frequenz von Frühgeburten, die sie durch Folatprophylaxe wirkungsvoll senken können. Ähnlich positiv durch Folatgaben senken BAUMSLAG et al. (1970) in ihrem Krankengut die Frühgeburtenfrequenz. HIBBARD & SMITHELLS (1965) haben die FIGLU-Exkretion von Müttern mißbildeter Kinder (speziell mit ZNS-Mißbildungen) untersucht und mit der FIGLU-Exkretion von Müttern gesunder Kinder verglichen. Etwa 2/3 der Mütter mißbildeter Kinder hatten abnorme FIGLU-Exkretion, dagegen nur 17% der Mütter gesunder Kinder. Dieser Befund ist bis heute weder widerlegt noch bestätigt.

Zur Vermeidung möglicher Komplikationen für Mutter und Kind haben sich daher verschiedene Untersucher für eine Folatprophylaxe in der Gravidität ausgesprochen. Erwähnt seien BJERRE (1967), CHANARIN et al. (1968), COOPER et al. (1970), HANSEN & RYBO (1967), HIBBARD & HIBBARD (1969, 1969), IYENGAR (1971), MARTIN et al. (1965), ROTHMAN (1970), WILLOUGHBY (1967) und WILLOUGHBY & JEWELL (1966). Über nachteilige Auswirkungen einer Folatprophylaxe ist bis heute nichts bekannt. Erst kürzlich haben GILES et al. (1971) in einem Doppelblindversuch an einem umfangreichen Patientenmaterial in einer Längsschnittserie durch die gesamte Schwangerschaft hindurch eine tägliche Dosierung von 5 mg Folsäure getestet und keine nachteiligen Veränderungen gefunden. Diese Dosis stellt mindestens das Zehnfache des gesteigerten Folatbedarfs in der Schwangerschaft dar.

1.4. Eigene Fragestellungen

Ein Grund für die Nichtbeachtung des Problemkomplexes Folatmangel/Schwangerschaft im deutschen Schrifttum der letzten 20 Jahre mag in der Unzugänglichkeit brauchbarer Folatnachweise liegen, von denen nur die älteren und umständlicheren Verfahren publiziert worden sind. Bei einem Aufenthalt im Laboratorium von I. CHANARIN im Juli 1971 konnte ich einen halb-automatischen Folatnachweis mit einer chloramphenicol-resistenten Mutanten (NCIB 10463) von *Lactobacillus casei* kennenlernen. Folgende methodisch-technischen Probleme ergaben sich zunächst:

1. Modifizierung des Originalverfahrens zu einer unter hiesigen Bedingungen verwendbaren Form;
 2. Überprüfung der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse sowie Vorversuche für eine Verwendung des Verfahrens zur Bestimmung von Folatgewebespiegeln.
- Weiter war von Interesse, ob unter westberliner Lebensbedingungen bei Schwangeren Veränderungen der Serumfolatspiegel nachweisbar sind. Wegen der größeren Genauigkeit von Untersuchungen an ein- und demselben Kollektiv wurden daher im Spätherbst 1971 Längsschnittuntersuchungen gestartet, an denen festgestellt werden sollte,
3. ob, in welcher Häufigkeit und in welchem Ausmaß Veränderungen der Serumfolatspiegel bei unbehandelten Schwangeren über die gesamte Schwangerschaft hinweg auftreten;
 4. ob und in welchem Umfang eine "Blindprophylaxe" mit einer Folat-Eisen-Kombination mögliche Veränderungen der Folat- und Eisenwerte verhindert;
 5. ob und in welchem Umfang bei unbehandelten trächtigen Ratten vergleichbare Änderungen des Serumfolatspiegels auftreten;
 6. ob auch bei hormoneller Kontrazeption Folatspiegeländerungen nachweisbar sind.

Zusätzlich zur Folatbestimmung mußte eine photometrische Bestimmung des Serumeisens und der Eisenbindungskapazität mit Tripyridyl-s-triazin nach O'MALLEY et al. (Clin. Chem. 16(1970),92) modifiziert und überprüft werden. Die klinische Überwachung der Schwangeren erfolgte im Rahmen der

prospektiven Untersuchungsreihe der DFG durch K.-P. HAMPEL, die der Frauen mit kontrazeptiver Medikation durch J. NEVIN-NY-STICKEL, beide Frauenklinik Charlottenburg der Freien Universität Berlin. Beide Versuchsreihen laufen Anfang 1973 aus und sollen dann einer umfangreichen korrelationsstatistischen Analyse unter Verwendung anderer hämatologischer und gynäkologischer Daten unterzogen werden. -

Submikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Folatantagonisten auf embryonale Gewebe sind kaum bekannt. In

Zusammenarbeit mit einer Arbeitsgruppe am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin (E. KÖHLER) wurden daher Methotrexat-Effekte auf die Frühentwicklung der Ratte untersucht. Ziel der Untersuchung war es, einige überraschende Effekte des Methotrexat zu erklären. Hierbei sollte untersucht werden,

7. ob bei induziertem Folatmangel morphologische Veränderungen auftreten, die den Zell(kern)veränderungen bei alimentärem Folatmangel adulter teilungsaktiver Gewebe entsprechen.

2. Folatnachweisverfahren

Das optische Verhalten (UV-Spektren u. dgl.) von PteGlu und den daraus abgeleiteten reduzierten Derivaten ist in biologischen Materialien (Serum, Gewebe) nicht zum qualitativen oder quantitativen Nachweis brauchbar. Gleiches gilt für eine fluorometrische Methode (ALLFREY et al. 1949) sowie für eine auf der Farbreaktion von BRATTON & MARSHALL (1939) beruhende chemische Methode von HITCHINGS et al. (1947), die nur zur Gehaltsbestimmung pharmazeutischer Präparationen Verwendung gefunden hat.

2.1. Arten der Folatbestimmung in biologischem Material

Zur Identifizierung (ZAKRZEWSKI & NICHOL 1953) definierter Folatderivate muß eine Aufarbeitung der Körperflüssigkeit oder des Organextraktes vorausgehen. Die Auftrennung kann dann durch chromatographische Methoden (aus Nahrungsmitteln: BUTTERWORTH jr. et al. 1969; Papierchromatographie: SCHOEN 1953; Ionenaustausch-Dünnschichtchromatographie: COPENHAVER & O'BRIEN 1969) erfolgen. Zur Auftrennung der Blutfolate sind chromatographische Verfahren eingesetzt worden von TOENNIS et al. (1952, 1956), USDIN (1953), USDIN et al. (1956) und BIRD et al. (1965). Es liegen jedoch noch immer keine exakten Angaben über die Anteile einzelner Folatderivate z.B. am Serum"folat" vor. Neben den Serumuntersuchungen liegen noch eine Anzahl von Studien über das Leber"folat" vor (NORONHA & SILVERMAN 1962, BENNETT et al. 1964, BIRD et al. 1965, CHANARIN et al. 1966) sowie über proteingebundenes Folat in Milch und Körperflüssigkeiten (METZ et al. 1968; MARKKANEN & PELTOLA 1970, 1971). Zur vollständigen Messung allen Gewebefolates muß erst eine Behandlung mit Conjugase (Best.-Meth. von KRUMDIECK & RAUCH 1970) vorausgehen, die die gebundenen Folate freisetzt und z.B. der mikrobiologischen Bestimmung zugänglich macht. Wohl die erste Übersicht, die Vitaminspiegel in Geweben mit Einschluß der Folataktivität angibt stammt von WILLIAMS (1943).

Verwendbare Methoden zur Bestimmung des Serumfolats umfassen

- a) mikrobiologische Verfahren;
- b) Radioimmuntests;
- c) Radioisotopenverdünnungstechniken.

Hiervon stellen die mikrobiologischen Verfahren die gebräuchlichsten Folatnachweise dar. Ein sehr spezifischer Radioimmuntest (COSTA & ROTHENBERG 1971; ROTHENBERG & GIZIS 1971; ROTHENBERG 1972) sowie eine Radioisotopenverdünnungsmethode (WAXMAN et al. 1970, 1971) haben noch keine weitere Verbreitung gefunden und stellen hohe Anforderungen an den apparativen Aufwand. Sie sind in Zukunft sicher für gezielte Untersuchungen mit großem Auswertungswert einsetzbar.

2.2. Mikrobiologische Nachweisverfahren für Folsäurederivate

In den mikrobiologischen Tests zur Folatbestimmung wird das Wachstum folatabhängiger Testorganismen photometrisch oder titrimetrisch verfolgt. Die titrimetrische Bestimmung (TEPLY & ELVEHJEM 1945; ANDREWS & SCHWEIGERT 1953) hat sich jedoch als zu umständlich erwiesen.

Methoden zur mikrobiologischen Folatbestimmung (Übersichten bei JUKES 1955, BAKER & SOBOTKA 1962) stammen von zahlreichen Autoren, z.B. von BAKER et al. (1959), BAKERMAN (1961), CHANARIN & BERRY (1964), CHANARIN (1969), COOPERMAN (1967, 1968), COOPERMAN et al. (1960), HERBERT (1960) und SPRAY (1964). Alle diese Methoden, die mehr Modifikationen darstellen, beruhen auf dem Wachstum einer Testkultur mit dem unbekannten Folat der Gewebepräparation oder des Serums im Vergleich zu bekannten Konzentrationen von PteGlu. Jedes dieser Verfahren verlangt steriles Arbeiten. Die Testorganismen sind Lactobacillus casei ATCC 7469, Streptococcus faecalis R (früher Streptococcus lactis; zum Folatstoffwechsel in dieser Mikrobe vgl. McELWEE & SCOTT 1972) sowie Pediococcus cerevisiae (früher Leuconostoc citrovorum; über Folatwuchsfaktoren für die-

sen Organismus vgl. BROQUIST et al. 1949). Diese drei Testorganismen zeigen mit den Folatderivaten biologischer Präparationen unterschiedliches Wachstum (vgl. Tabelle 3), was zur partiellen Differenzierung dieser Substanzen benutzt wird.

Tabelle 3: Wachstumsunterschiede der Testorganismen mit verschiedenen Folsäurederivaten (nach BLAKLEY 1969)

Verbindung	L. casei	S. faecalis	P. cerevisiae
PteGlu	+	+	-
DHF	+	+	-
THF	+	+	+
5-Formyl-THF	+	+	+
10-Formyl-PteGlu	+	+	-
10-Formyl-DHF	+	+	-
10-Formyl-THF	+	+	+
5-Methyl-THF	+	-	-
Polyglutamat	+	+	-
Polydiglutamat	+	-	-
Polyhexaglutamat	-	-	-
THF-diglutamat	+	-?	+

DHF = Dihydrofolat, THF = Tetrahydrofolat; + bezeichnet ein Wachstum von mindestens 50 % des Maximums, - ein Wachstum unter 5 % des Maximums.

Pediococcus cerevisiae wächst danach vornehmlich mit Tetrahydrofolat und den hieraus abgeleiteten Derivaten, *L. casei* mit PteGlu und den reduzierten Verbindungen, nur nicht mit dem (häufigsten) Hexaglutamat. Mit *L. casei* wird also die Gesamtheit des nicht-konjugierten "freien" Folates gemessen. Mit der Entwicklung automatischer Verfahren zur Serumfolatbestimmung wurde aus *L. casei* ATCC 7469 durch schrittweise Adaptation an Chloramphenicol ein chloramphenicol-resistenter Stamm entwickelt, der diese automatischen Verfahren (DAVIS et al. 1970; MILLBANK et al. 1970) erst möglich machte. Der in der vorliegenden Untersuchung verwendete Stamm NCIB 10463 von *L. casei* ist gleichfalls chloramphenicol-resistent.

2.4. Folatbestimmung mit *Lactobacillus casei* NCIB 10463

2.3.1. Beschreibung des Verfahrens

Die nachfolgende Beschreibung basiert auf der unveröffentlichten halbautomatischen Bestimmungsmethode, die im Laboratorium von I. CHANARIN Verwendung findet. Sie enthält die Veränderungen, die sich im Verlauf einer einjährigen eigenen Erfahrung mit dieser Methode ergeben haben sowie alle die Modifizierungen, die bei Übernahme des Verfahrens notwendig waren.

1. Geräte und Chemikalien

EPPENDORF-Photometer (mit 623 nm-Filter)
Brutschrank
Laborzentrifuge
pH-Meter
Oxford-Pipettor
0,05 ml-EPPENDORF-Pipette
Magnetrührer
randlose Pyrex-Teströhrchen (150 x 19 mm)
Metallgestelle zur Aufnahme von drei-eihen dieser
Röhrchen, mit lose aufsitzendem kappēartigen Deckel
verschraubbare Kulturgläser
Folsäure p.a. (Merck)
L-Ascorbinsäure p.a. (Merck)
Chloramphenicol-Na-Succinat (Leukomycin^R; als Chl. abgek.)
3 n KOH
1 n NaOH
DIFCO Lactobacilli broth AOAC
DANO folic acid Casei medium nach BAIRD & TATLOCK
(Danochemo, 72 Blegdamsvej, Copenhagen O)
Lactobacillus casei NCIB 10463 (Torry Research Station,
Aberdeen, Scotland)

2. Folsäure-Vorratslösung

Folsäure wird im Trockenschrank bei 100°C zwei Stunden getrocknet und anschließend im Exsikkator über P₂O₅ aufbewahrt. Exakt ausgewogene 150,00 mg Folsäure werden im 11-Meßkolben in etwa 10 ml Wasser (Aq. dest.) tropfenweise bis zur Lösung mit 1n NaOH versetzt und mit dest. Wasser auf 11 aufgefüllt. Diese Lösung ist in brauner Flasche bei 4°C etwa 2 - 4 Monate haltbar.

3. Erhaltungsmedium

DIFCO-Medium wird nach Vorschrift unter Zusatz von 10 bzw. 30 mg Chl./100 ml hergestellt und in 10 ml-Portionen in

die verschraubbaren Kulturgläser eingefüllt. Die Gläser werden dann 10 Minuten bei 1,1 kp/cm² autoklaviert.

4. Anzucht der Testbakterien.

- a) Das gefriergetrocknete Präparat (Bakterientrockenmasse + Papierstreifen) wird in 10 ml des 100 µg Chl. pro ml Medium enthaltenden DIFCO-Mediums übertragen.
- b) Inkubation: 24 Stunden, 37°C.
- c) 1 ml von b) werden in 10 ml des 100 µg Chl./ml enthaltenden Mediums aufgenommen und wie b) inkubiert;
- d) 1 ml von c) - weiter wie b);
- e) 1 ml von d) - weiter wie c).
- f) Nach der Passage e) wird 1 ml des Inkubats in das 300 µg Chl./ml enthaltende DIFCO-Medium übertragen und bei 4°C maximal 10 Tage ohne Wechsel aufbewahrt (Reservekultur).

5. Anzucht des Inokulums.

Am Tag vor dem Testbeginn wird 1 ml der Reservekultur in 10 ml des 100 µg Chl./ml enthaltenden DIFCO-Mediums übertragen und 16 Stunden bei 37°C bebrütet.

6. Herstellung des Folatstandards.

Diese Lösungen werden unmittelbar vor dem Testansatz hergestellt! 1 ml der Folsäure-Reservelösung wird im 11-Meßkolben mit dest. Wasser aufgefüllt. Diese Lösung enthält 150 ng PteGlu/ml. Mit dieser Folsäure-Lösung werden in 100 ml-Meßkolben die Standardkonzentrationen nach folgendem Schema hergestellt:

Proben-Nr.	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Folsäure-Lös. (ml)	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0
Wasser (ml)	100	99	98	97	96	94	92	90	88
Folsäure-Konz. (ng/ml)	0	1,5	3,0	4,5	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0

Eine Extrapolation über 18 ng PteGlu/ml Probenmaterial ist nicht möglich; Sera mit diesen Werten werden 1:1 mit Na-P_i-Puffer (pH 5,7) verdünnt.

7) Herstellung des Testansatzes

a) Anordnung der beschrifteten Pyrex-Gläschen in den Gestellen so, daß jede Standardkonzentration dreifach, jede Serumbestimmung doppelt erfolgen kann.

b) DANO-Medium wird in doppelter Stärke (7,07 g/100 ml dest. Wasser + 20 mg Chl./100 ml) mit einem aus der halben Zahl der Probengläschen (je 5 ml) + weiteren 50 ml berechneten Volumen in einem Weithals-Erlenmeyer über einem Asbestnetz kurz aufgeköcht und sofort mit dem gleichen Volumen dest. Wasser verdünnt. Das Medium wird mit einem Magnetrührstab beschickt, der Kolben mit Alu-Folie verschlossen und abgekühlt. Nach dem Abkühlen wird das Medium mit 100 mg L-Ascorbinsäure/100 ml versetzt und der Kolben auf dem Magnetrührer belassen. Nach guter Durchmischung wird das Medium mit 3 n KOH auf pH 6,1 - 6,3 eingestellt. 5 ml dieses DANO-Mediums werden bei 4°C als Photometer-Nullwert aufbewahrt.

Der Rest des Mediums wird anteilig mit 0,1 ml des konzentrierten Inokulums pro Liter beimpft und mindestens 20 Minuten auf dem Magnetrührer gut durchmischt. Der Kolben verbleibt auch während der späteren Probenvolumina-Entnahme auf dem Rührer.

c) Konzentrierung des Inokulums. Die Übernachtskultur (vgl. 5.) wird 5 Minuten mit etwa 4000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Sediment wird in 10 ml DANO-Medium aufgenommen, kräftig durchmischt und erneut zentrifugiert. Dieser "Wasch"vorgang wird zwei weitere Male wiederholt. Das letzte Sediment wird in zwei ml DANO-Medium aufgenommen (= konzentriertes Inokulum).

d) Beschickung der Teströhrchen. Jedes Teströhrchen wird mit 5 ml beimpftem DANO-Medium beschickt. Aus den Standardlösungen 0 (= dest. Wasser) - 8 sowie den Serumproben werden mit der automatischen Pipette je 0,05 ml in die Teströhrchen pipettiert, die Gestelle mit den Kappendeckeln verschlossen und 22 Stunden bei 37° inkubiert.

8) Messung

Das Wachstum in den Probengläschen wird mit je 5 ml kaltem Wasser pro Glas (Oxford-Pipettor) abgestoppt. Die

Proben werden gut durchmischt und die Extinktionen bei 623 nm in Küvetten mit 1 cm-Schichtdicke gegen den Photometer-Nullwert (vgl. 7b) registriert.

Von allen Standard- und Probenextinktionen wird die gemittelte Extinktion der Probe 0 (= Wachstum ohne PteGlu) abgezogen. Aus den gemittelten Standarextinktionen wird die Standardkurve auf mm-Papier gezeichnet. Die Extinktionsdifferenz zwischen den Proben 0 und 8 muß mindestens 180 betragen. Die Folatkonzentrationen der gemittelten Serumdoppelbestimmungen werden aus der Standardkurve abgelesen.

9) Aufbewahrung der Serumproben

Hämolysefreies Serum kann mit einer Spur L-Ascorbinsäure ohne Verlust an Folataktivität für mindestens ein Jahr aufbewahrt werden.

10) Messung des Erythrozytenfolats

a) Abschätzung aus den Serumwerten bei Kenntnis des Hämatokrits (n. CHANARIN) nach

$$\text{Erythrozytenfolat} = \frac{\text{Serumfolat} \times 20 \times 100}{\text{Hämatokrit}}$$

b) direkte Messung: Das bei der Hämatokritbestimmung erhaltene Zellvolumen wird 1:20 mit 1%iger wss. L-Ascorbinsäure hämolysiert. Dieses Hämolysat wird wie Serum getestet. Normbereich nach CHANARIN 100 - 450 ng/ml.

11) Zeitplan für die Folatbestimmung in 30 - 40 verschiedenen Serumproben.

Folgender Zeitplan hat sich als günstig erwiesen:

1. Tag: 17⁰⁰ Ansatz des Inokulums.
2. Tag: 8⁰⁰ Vorbereitung des Testansatzes
 - 9⁰⁰ Konzentrierung des Inokulums und Herstellung der Folatstandardlösungen
 - 10⁰⁰ Beschickung des Testansatzes
 - 11⁰⁰ Beginn der Inkubation des Testansatzes
3. Tag: 9⁰⁰ Abstoppen des Wachstums und Messung.

2.3.2. Überprüfung des Verfahrens

Folgende Fragen ergaben sich aus der Anwendung des Verfahrens:

- 1.) Kann durch eine Reduzierung der Chloramphenicol-Konzentration im Testmedium die Differenz zwischen den Extinktionen der höchsten Folatstandardkonzentration und dem Nullwert brauchbar erhöht werden ?
- 2.) Ist eine Erweiterung des Meßbereiches über 18 ng Folat/ml Testmaterial im Rahmen der Testbedingungen möglich ?
- 3.) Wie hoch liegt die Genauigkeit der Messungen, d.h. wie groß sind die Extinktionsunterschiede innerhalb der Doppelbestimmungen ?
- 4.) Kann die Extinktionsdifferenz zwischen Nullwert und höchster Folatkonzentration durch eine verlängerte Inkubationszeit erhöht werden ?
- 5.) Wie wirken sich Verdünnungen der Sera und von Organextrakten auf die Meßergebnisse aus ?
- 6.) Existiert eine Beeinflussung der Meßwerte aus der Mischung von Sera bekannter Folatkonzentrationen ?
- 7.) Lassen sich Serumproben tatsächlich ohne Aktivitätsverlust bei - 20°C in Gegenwart von L-Ascorbinsäure aufbewahren ?
- 8.) Wie wirken sich Zusätze von Thymidin auf das Wachstum von *L. casei* aus ?

Die Standardkurven (Abb. 2, Tab. 4) variieren von Test zu Test. Diese Variation ist unkontrollierbar und entzieht sich der statistischen Analyse (REIZENSTEIN 1965). Erklärungsversuche wie der von ANDERSON & COWAN (1968), die eventuelle Zusammenhänge mit der Tageshelligkeit annehmen, besitzen doch wohl nur spekulativen Charakter. Mit Konzentrationen von 0,01 mg Chloramphenicol-Na-Succinat/ml DANO-Medium wird die Extinktionsdifferenz zwischen Nullwert und Folathöchstkonzentration, die mit 0,1 mg Antibiotikum/ml Medium sehr konstant zwischen 200 und 300 liegt, auf sehr stark variierende Werte von teilweise über 500 angehoben, d.h. das Wachstum der Kulturen ist verstärkt und die Steilheit der Kurven und damit die

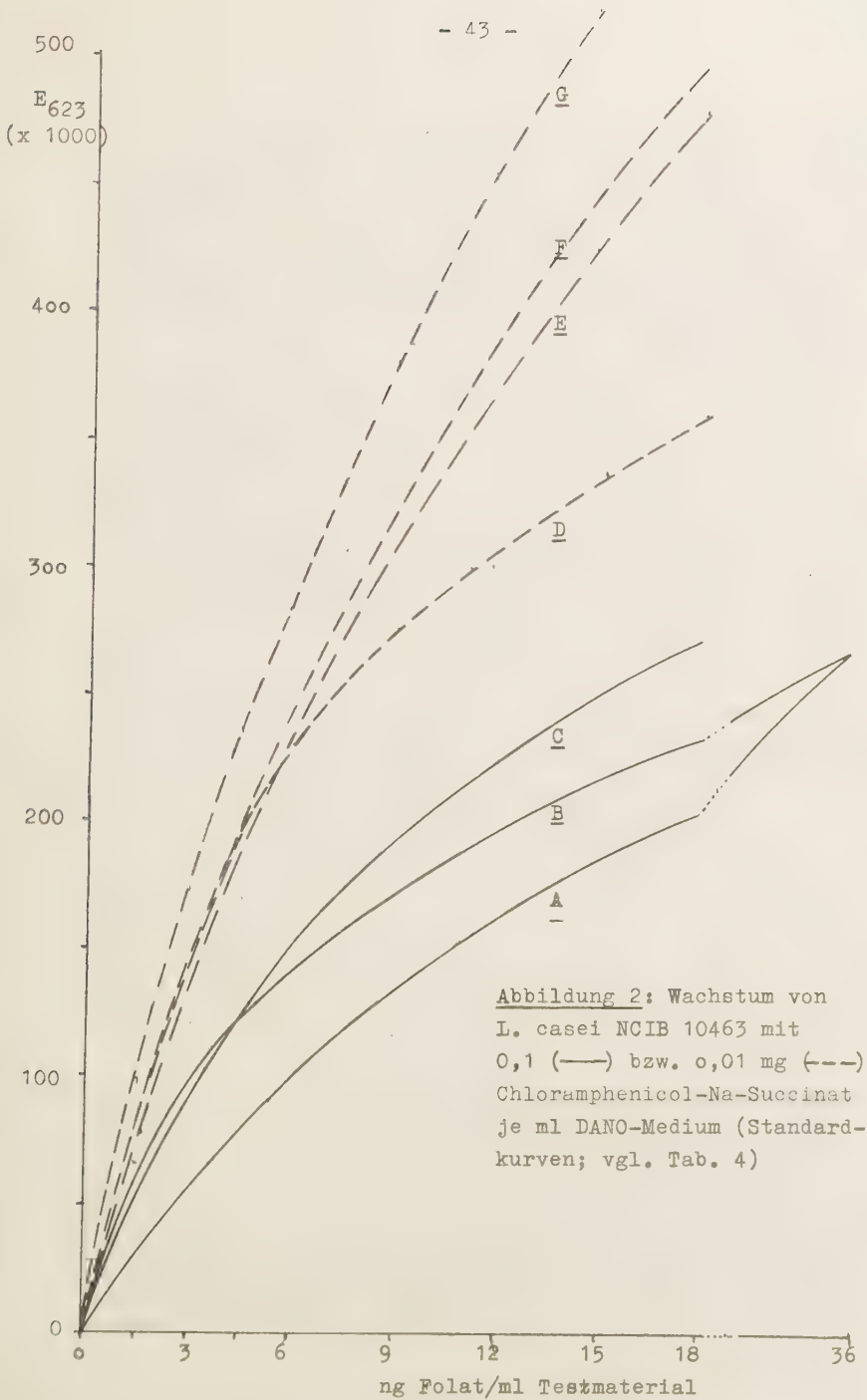
Tabelle 4:

Standardkurven. Wachstum von *L. casei* NCIB 10463 in Abhängigkeit von der Chloramphenicol-Konzentration (Meßwerte der Extinktionen bei 623 nm bezogen auf Leerwertextinktionen = 0).

0,1 mg Chloramphenicol-Na-Succinat/ml Medium										
ng Folat/ml Standard	E ₆₂₃ (x 1000)									
0	(112)	(96)	(104)	(52)	(53)	(53)	(61)	(61)	(62)	--
1,5	32	61	41	58	56	57	53	54	54	55
3,0	59	99	81	93	94	94	93	96	95	94
4,5	82	123	106	124	126	128	126	127	127	126
6,0	100	144	142	150	151	154	156	155	155	154
9,0	132	170	186	190	192	193	194	193	191	192
12,0	164	197	230	228	227	227	231	230	230	229
15,0	187	219	254	252	252	253	255	254	252	253
18,0	206	236	284	271	270	273	269	269	268	270
36,0	268	268	---	---	---	---	---	---	---	---
n Einzelbestimm.	3	3	3	-	-	-	-	-	-	6
Bemerk.*:	A	B	-	-	-	-	-	-	-	C

0,01 mg Chloramphenicol-Na-Succinat/ml Medium										
ng Folat/ml Standard	E ₆₂₃ (x 1000)									
0	(236)	(340)	(285)	(282)	(150)					
1,5	66	78	91	79	98					
3,0	123	152	171	142	173					
4,5	169	202	218	189	237					
6,0	231	230	265	244	284					
9,0	332	274	333	324	381					
12,0	377	300	394	381	452					
15,0	427	336	443	443	518					
18,0	467	360	480	496	568					
n Einzelbestimm.	3	3	3	3	3					
Bemerk.*:	-	D	E	F	G					

*Kurven in Abb. 2

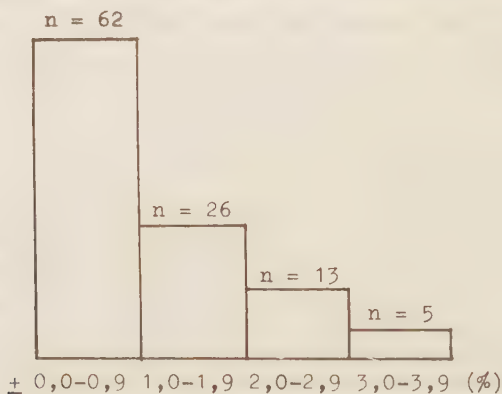


Meßgenauigkeit sind erhöht. Gleichzeitig ist aber auch das Wachstum ohne Folat (vgl. Tab. 4) stark erhöht und die Anzahl unbrauchbarer Bestimmungen, die bei eingehaltenen Testbedingungen etwa 1:15 beträgt, ist offenbar durch bakterielle Verunreinigungen stärker erhöht. Außerdem reichen die unter eingehaltenen Testbedingungen gemessenen Extinktionen von 200 - 300 für eine genügend genaue Ermittlung der Folataktivität aus.

Eine Erweiterung des Meßbereiches über 18 ng Folat/ml Probenmaterial ist nicht möglich (Abb. 2), da der weitere Extinktionszuwachs keine exakte Ablesung der Folatwerte mehr gestattet. Konzentrationen über 18 ng/ml müssen daher verdünnt werden.

An 106 aufeinanderfolgenden Serumdoppelbestimmungen aus 4 Ansätzen wurden die prozentualen Abweichungen beider Meßwerte vom Mittelwert ausgezählt und graphisch dargestellt (Abb. 3; n. ROETZ & HAMPEL 1972):

Abbildung 3: Abweichungsausmaß von Folatdoppelbestimmungen



Über 50% der Doppelbestimmungen differieren danach um weniger als $\pm 1\%$. Abweichungen über 5% zwischen den Extinktionen sind sehr selten und entstehen offenbar beim Pipettieren der 0,05 ml-Volumina der viskösen Sera. Diese Messungen wurden wiederholt.

Die Inkubationsdauer von 22 Stunden für die Testansätze ist eine optimale Zeit. Tabelle 5 und Abbildung 4 veranschaulichen die Entwicklung einer Standardkurve unter Testbedingungen nach 9, 12, 15, 18, 20, 22 und 24 Stunden Inkubationsdauer. Bei 24stündiger Inkubation werden zwar höhere Extinktionen gemessen, aber auch der Folat-leerwert hat zwischen 22 und 24 Stunden beträchtlich zugenommen und der maximale Zuwachs der Extinktionen zwischen 20 und 22 Stunden zeigt an, daß Messungen während dieser Zeit die Phase des maximalen Wachstums der Kulturen erfassen.

Serumproben mit Folataktivitäten über 18 ng/ml müssen mit Puffer verdünnt werden. Nachfolgende Tabelle 6 stellt einige Meßergebnisse zusammen:

Tabelle 6: Folatbestimmung in Serumverdünnungen
(Testbedingungen; Werte aus Doppelbestimmungen)

Material	Verdünnung				
	1:1	(6x1:8) Abweichung (%)	1:2	1:4	1:8
Serum A	15,0	(16,0 ca. + 6)	7,4	3,8	2,0
Serum B	16,8	(18,4 ca. +10)	8,3	4,3	2,3
Serum C	8,4	(10,4 ca. +25)	4,2	2,2	1,3
Serum D	14,4	(15,6 ca. + 6)	7,3	3,7	1,9

Diese Meßwerte wurden mittels einer einzigen Standardkurve ermittelt. Bei stärkerer Verdünnung ergibt sich dabei ein Zuwachs, der bei geringen Ausgangskonzentrationen beträchtlich zu hohe Werte vortäuscht. Eine Erklärungs-möglichkeit für diese Erscheinung kann nicht gegeben werden. Notwendige Verdünnungen innerhalb des Untersuchungs-programms waren über 1:2 hinaus jedoch nicht notwendig.

Tabelle 5:

Wachstum von *L. casei* NCIB 10463 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (0,1 mg Chloramphenicol-Na-Succinat/ml Medium; Meßwerte der Extinktionen bei 623 nm bezogen auf Leerwertextinktion = 0).

<u>ng Folat</u> ml	0	1,5	3	4,5	6	9	12	15	18
Inkubationszeit:	$E_{623}(\times 1000)$								
9 Std.	(18)=0	5 5	5 5	5 5	6 6	6 6	7 7	8 8	9 9
12 Std.	(25)=0	5 5	5 5	5 5	7 7	7 7	8 8	10 10	12 12
15 Std.	(45)=0	5 5	6 6	9 9	11 11	12 12	14 14	17 16	19 20
18 Std.	(57)=0	18 17	30 31	32 32	37 37	42 43	44 44	48 48	54 55
20 Std.	(62)=0	31 32	49 50	63 65	74 76	88 88	99 101	108 109	116 117
22 Std.	(68)=0	45 46	78 80	101 101	119 121	157 156	183 184	208 210	229 231
24 Std.	(84)=0	76 75	110 111	138 140	172 175	222 220	260 259	291 292	320 324

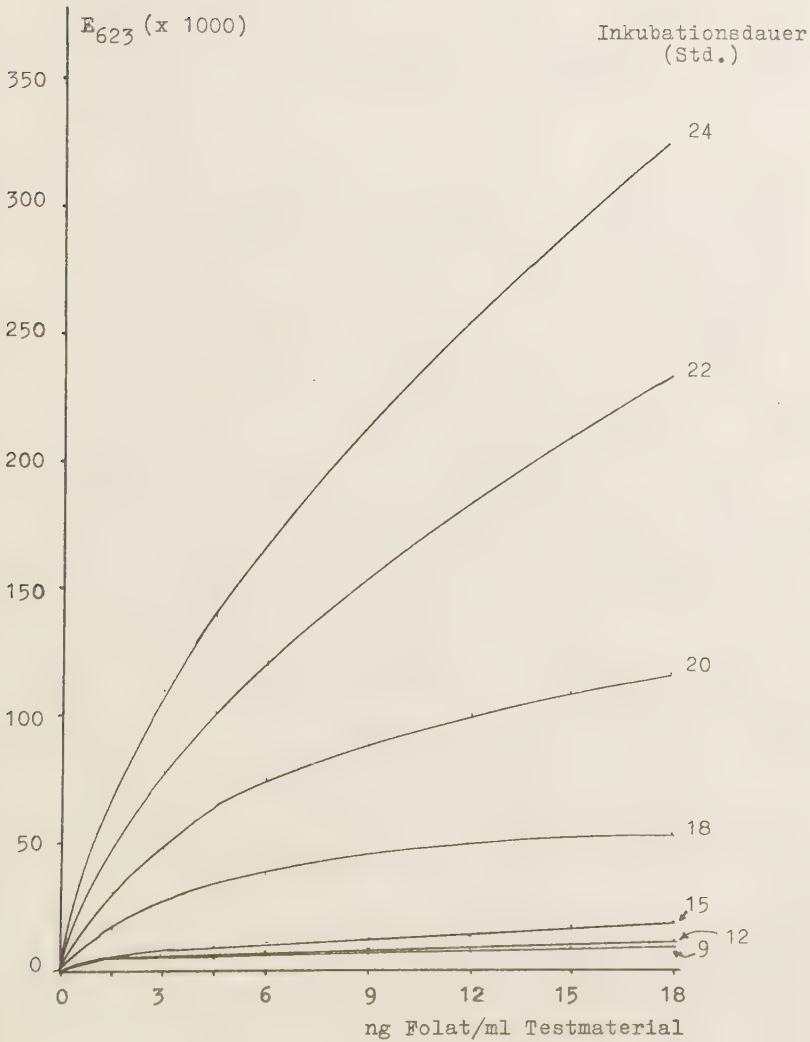


Abbildung 4: Entwicklung einer Standardkurve
(Testbedingungen; vgl. Tab. 5)

Bei der Folatbestimmung in einem Rattenleberhomogenat (20,6 mg Protein/ml, 1:100 mit $K-P_1$ -Puffer - 1% L-Ascorbinsäure) wurden 13,1 (13,1, 13,0, 13,3) ng Folat/ml gemessen, bei einer weiteren Bestimmung des 1:200 verdünnten Homogenates 6,2 (5,8, 6,2, 6,4) ng Folat/ml. Hier hat die weitere Verdünnung eine Abnahme der Meßwerte bewirkt.

COWAN et al. (1966) berichten aus Versuchen mit Serum-mischungen bekannter Folatkonzentration bei Zumischung von Sera von Personen mit Folatmangel eine Reduktion der Aktivität in den Mischungen, bei Zumischung von Sera folatnormaler Personen eine Steigerung der Folataktivität in den Mischungen. Ersteres ließe sich mit dem Vorkommen unbeladener Carrierproteine (METZ et al. 1968) in Folatmangelsera erklären, wobei die entstehenden Komplexe nicht in die Folatbestimmung mit L. casei eingehen dürften. Der von den Autoren beschriebene Effekt, den REIZENSTEIN (1965) nicht feststellte, kann jedoch auf andere Änderungen der Proteinzusammensetzung der Folatmangelsera (vgl. MULGAONKAR & SREENIVASAN 1958) zurückgehen. Völlig unklar ist der beobachtete stimulierende Effekt normaler Sera. In eigenen Versuchen konnten die Beobachtungen von COWAN et al. nicht bestätigt werden (Tab. 7).

Tabelle 7: Folataktivitäten in Serum-mischungen
(Testbedingungen; Mischungen aus gleichen Volumina; Zahlenangaben in ng Folat/ml)

Folat		Meßwerte der Mischungen				
Serum A	18,0	10,0	10,1	10,0	10,6	10,8
Serum B	3,0	10,7	10,1	10,5	10,9	10,3
Mischung (theoret.)	10,5	Mittelwert 10,4				
Serum C	16,8	10,3	10,4	10,5	9,8	10,2
Serum B	3,0	9,7	10,1	9,5	9,3	10,0
Mischung (theoret.)	9,9	Mittelwert 10,0				
Serum D	6,9	7,5	7,4	7,6	7,6	8,0
Serum E	9,0	8,2	8,1	8,1	7,7	8,3
Mischung (theoret.)	8,0	Mittelwert 7,9				

Bei einer zufälligen Paarung von Einzelmessungen, z.B. 9,3/9,5 oder 10,4/10,5 im Beispiel C/B von Tabelle 7, könnte durchaus der Eindruck einer Hemmung oder Aktivierung entstehen. Für die alten Sterilmethoden sieht übrigens REIZENSTEIN (1965) Abweichungen von 14% als durchaus normal an.

Die von verschiedenen Autoren (Literatur s. BLAKLEY 1969) bestätigte Stabilisierungsfunktion der L-Ascorbinsäure (Beziehungen auch zum Folatstoffwechsel, vgl. WILLIAMS jr. 1951) konnte an einigen Proben (Tab. 8) bestätigt werden. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die bei - 20°C aufbewahrten Proben zu den Messungen aufgetaut und danach wieder eingefroren werden mußten.

Tabelle 8: Einfluß der Aufbewahrungszeit von Serumproben in Gegenwart von L-Ascorbinsäure auf die mit L. casei NCIB 10463 meßbare Folataktivität

Serum	Datum der Messung				
	12.11.71	5.1.72	17.3.72	10.5.72	19.8.72
1	14,3	14,0	14,4	14,5	14,5
2	---	9,3	8,9	9,2	9,1
3	3,8	3,9	3,7	3,7	3,8
4	---	---	16,7	16,5	16,8

Besonders bei der Untersuchung des "freien", im L. casei-Test direkt nachweisbaren Gewebefolat muß mit unkalkulierbaren Wachstumsbeeinflussungen durch Gewebefractionen gerechnet werden, auch bei Verwendung anscheinend optimal zusammengesetzter Medien. Die Beteiligung von Folaten am Nukleotidstoffwechsel läßt bei der Gewebefractionierung auftretende DNS- und RNS-Abbauprodukte als naheliegende Störungsfaktoren erscheinen. Während die Purine (Aufnahme

von Purinnukleotiden vgl. BALIS et al. 1953) im DANO-Medium enthalten sind, fehlt Thymidin (auch in Form von Thymidin, TMP, TDP oder TTP). Versuche zu einer Folatsubstitution durch Thymidin oder zur Aufhebung von Antifolatwirkungen durch Thymidin haben uns mehrfach beschäftigt, von BUTTERWORTH & PEREZ-SANTIAGO (1956) wurde sogar mit allerdings negativem Resultat eine Thymidintherapie der tropischen (Folatmangel-) Sprue versucht.

In den Abbildungen 5 und 6 sind Versuche über den Einfluß von Thymidin auf das Wachstum von *L. casei* NCIB 10463 zusammengestellt. Im Vergleich mit einer mittleren Folatstandardkonzentration von 9 ng/ml Standardlösung bewirkt eine 1000fache Thymidinmenge nur ein Wachstum von etwa 5% und 10% Wachstum werden erst mit der etwa 5500fachen Thymidinmenge gemessen.

Werden den Folatstandardkonzentrationen jedoch gleiche Thymidindmengen zugefügt, so tritt bei Mischung mit hohen Folatkonzentrationen eine Hemmung des Wachstums bis zu 10% auf, bei den geringeren Folatkonzentrationen ist dieser Effekt geringer ausgeprägt oder fehlt. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann nicht gegeben werden, vielleicht werden Transportprozesse beeinflusst (zur Folataufnahme von *L. casei* vgl. COOPER 1969). -

Insgesamt hat sich die hier beschriebene Methode als sehr genau erwiesen. Sie liefert gut reproduzierbare Ergebnisse und kann durchaus als Routinemethode verwendet werden.

Abbildung 5:

Wachstum von *L. casei* NCIB 10463 mit Thymidin (0,01 mg Chloramphenicol-Na-Succinat/ml Medium; Inkubationsdauer 22 Std.; Extinktionsangaben bezogen auf Leerwertextinktion = 0).

$\frac{\text{mg Thymidin}}{\text{ml Testlös.}}$	$\frac{\text{Thymidin}}{\text{Folat}}$	E_{623}^*	Wachstum (%)
0,009	1000	17	5
0,045	5000	64	19
0,09	10000	96	29
0,45	50000	109	33
$\frac{9 \text{ ng Folat}}{\text{ml Testlös.}}$	----	332	100
*Mittelwert aus drei Einzelmessungen, ($\times 10^3$)			

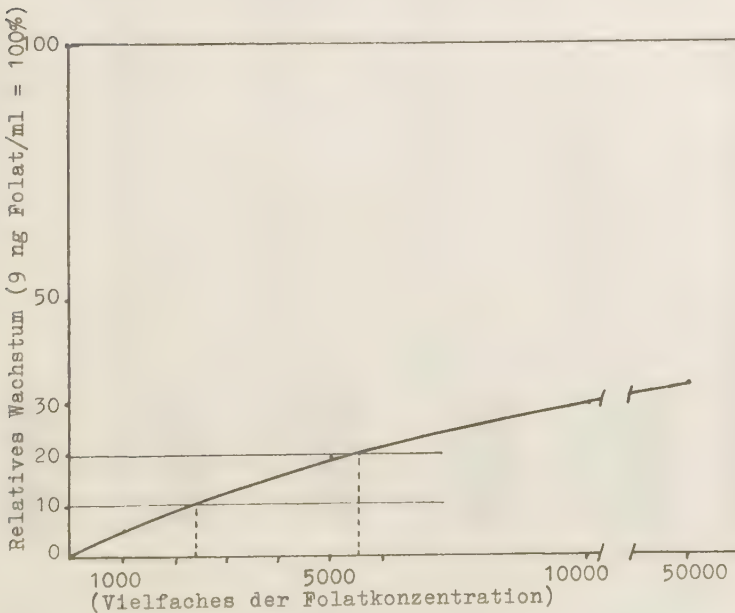
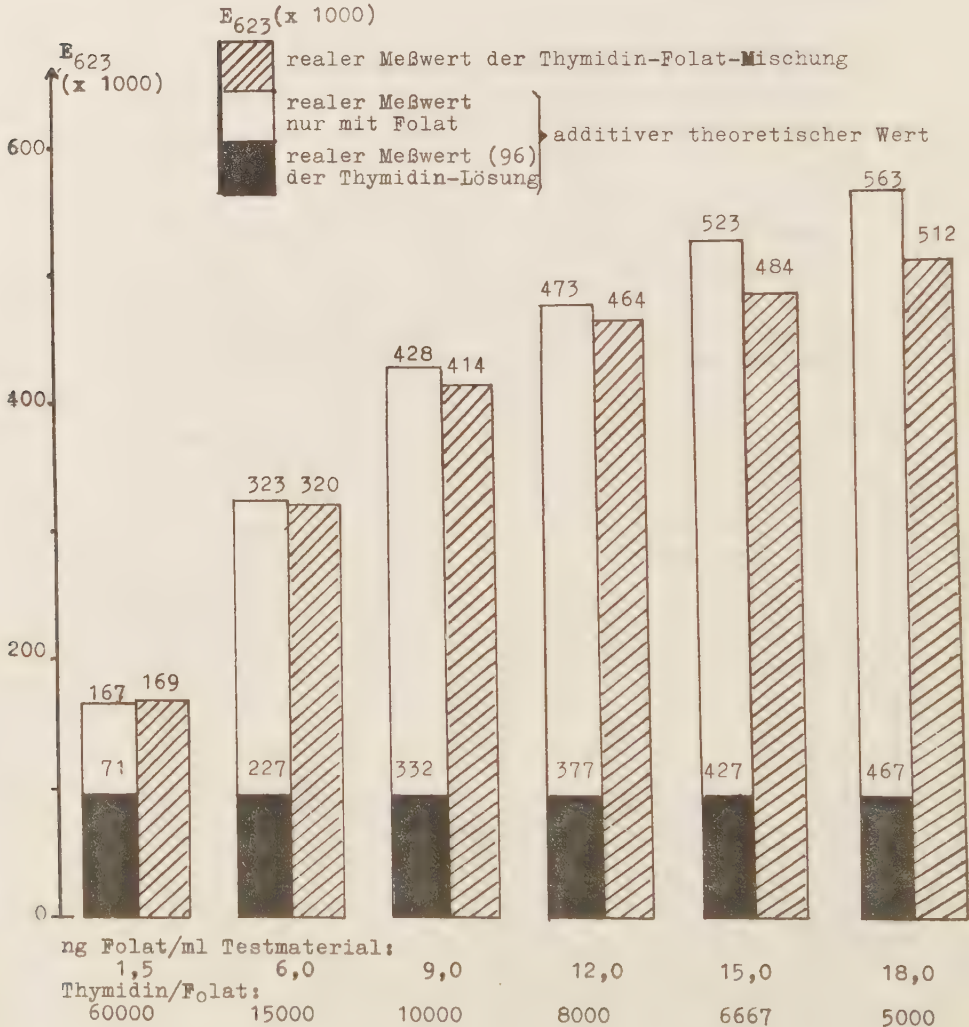


Abbildung 6 :

Einfluß eines konstanten Thymidinzusatzes (entsprechend 90000 ng/ml Lösung) auf verschiedene Folatkonzentrationen im Ansatz mit L. casei NCIB 10463 (0,01 mg Chloramphenicol-Na-Succinat/ml Medium; Angabe der auf Leerwert = 0 umgerechneten Extinktionen bei 623 nm; Mittelwerte aus je drei Einzelmessungen).



3. Eigene Untersuchungen über Folatmangel und Eisensättigung des Serums

3.1. Längsschnittstudie an schwangeren Frauen

Es sollte untersucht werden, ob unter den heutigen Lebensbedingungen in Westberlin (und der Bundesrepublik) bei schwangeren Frauen Veränderungen des Serumfolatspiegels beobachtet werden. Deutsche Arbeiten waren bis zu diesem Zeitpunkt unbekannt. Parallel dazu sollte untersucht werden, welche Veränderungen das Serumfolat bei einer ungezielten Blindprophylaxe mit Folat durch die gesamte Graviddauer hindurch erfährt. In diese Untersuchungen mit einbezogen wurden Bestimmungen des Serumeisens und der Eisenbindungskapazität des Serums, da nach internationalen Erfahrungen Eisenmangel wie Folatmangel zu den häufigsten Schwangerschaftskomplikationen zählen. Eine Eisen- und Folatprophylaxe gehört nach zahlreichen Autoren (vgl. Abschnitt 1.; CHANARIN in SJÖVALL et al. (1967): "Iron and folic acid are the two important additives in pregnancy") fast zur Routineprophylaxe der Schwangerschaft.

In Zusammenarbeit mit der durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft getragenen prospektiven Untersuchungsreihe (K.-P. HAMPEL) an der Frauenklinik Charlottenburg der Freien Universität Berlin wurden daher zwischen Spätherbst 1971 und Mai 1972 138 neu in die Reihe aufgenommene Frauen in das Folat/Eisen-Projekt aufgenommen. Die Hälfte davon erhielt ohne vorherige Bestimmung der Eisen- und Folatwerte prophylaktisch eine Kombination aus 350 µg PteGlu und 105 mg Eisen-II (als Sulfat). Sera wurden erstmals am Tag der Aufnahme, dann im Abstand von etwa 3 Monaten bis zur Geburt entnommen. Eine Folatprophylaxe ohne Berücksichtigung des Blutstatus ist bis zu Tagesdosen von 5 mg ohne jedes Risiko, wie Untersuchungen von GILES et al. (1971) an 692 Schwangeren berichten. Die Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen; sie sollen nach ihrer Beendigung im Januar 1973 auf statistische Korrelationen

zu anderen hämatologischen und gynäkologischen Befunden überprüft werden. Zur Sammlung spezieller Daten wurde eine Karteikarte entwickelt (Abb. 7).

Einer vorläufigen Mitteilung (ROETZ & HAMPEL 1972) sind die Daten in Tabelle 9 sowie die Abbildungen 8 und 9 entnommen. Sie zeigen an 23 abgeschlossenen unbehandelten Schwangerschaften und an 16 prophylaktisch behandelten Schwangerschaften die gemessenen Veränderungen der Folat und Eisenwerte. Während in der unbehandelten Gruppe beide Werte in der Gravidität abnehmen, wobei die Hauptabnahme jeweils zwischen dem ersten und zweiten Schwangerschaftsdrittel erfolgt, nehmen bei den behandelten Frauen die Folatspiegel fast kontinuierlich zu, während die Eisensättigung nahezu konstant bleibt. Es muß angemerkt werden, daß die bei unbehandelten Schwangeren fallenden Serumfolatspiegel bei etwa 20 % Werte erreichen, die nach allgemeiner Übereinstimmung neuerer Untersuchungen den für einen Folatmangel kritischen Wert von 3 ng Folat/ml Serum unterschreiten. Durch die Längsschnittstudie, d.h. die Untersuchungen an stets den gleichen Frauen wird eine Störung durch die bei physiologischen Werten sonst große Variabilität weitgehend eingeschränkt und die Aussagekraft einer relativ kleinen Fallzahl entscheidend erhöht. Die Untersuchungen bestätigen, daß auch bei unseren Lebensbedingungen in der Schwangerschaft ein alimentärer Folatmangel relativ häufig anzutreffen ist.

3.2. Untersuchungen an trächtigen Ratten

Folatspiegeluntersuchungen an Tieren liegen nur spärlich vor. Es sollte daher überprüft werden, ob bei Verwendung eines Standardfutters (Altrumin) während der Trächtigkeit normaler unbehandelter Wistarratten SW 69 Paderborn Veränderungen des Serumfolats nachgewiesen können.

Von 21 trächtigen Weibchen wurden vom Tag 10 der Schwangerschaft an je drei Tiere in Äthernarkose getötet. Das

Blut wurde durch Aortenpunktion mit einer Einwegspritze (meist 3 - 4 ml) entnommen, in Zentrifugengläschen bis

Abbildung 7: Karteikarte zur Erfassung der Daten für die Längsschnittuntersuchungen bei Schwangeren und Frauen unter Kontrazeptiva-Medikation

EMBRYONALPHARMAKOLOGIE Prof. Dr. H.-J. Merker - Projekt Folsäure/Eisen - Dipl.-Biol. R. Roetz				Lfd. Nr.				
Name:		Alter:	-para	Fam.-Stand:	Beruf:	Sozial- status:	Ärztlicher Befund:	Gruppe:
Datum:		geb.	J.	Letzte Regel:				
Bemerkungen:								
	Gravidität (Mens)	Ery. 10 ⁶ /mm ³	Hb g/o	Hämatokrit o/o	Serum-Fe µg/100 ml	Fe-Kapaz. µg/100 ml	Folsäure ng/ml	Therapie
								Messungen durch
R-137-deb	1/781 P.D							

Tabelle 9 :

Serumfolat und Eisensättigung im Schwangerschaftsverlauf.
Längsschnittuntersuchung.

Name	Serumfolat (ng/ml)			Eisensättigung (Serumeisen in % TEBK)		
	Schwangerschaftsdrittel			Schwangerschaftsdrittel		
	1	2	3	1	2	3
<u>Unbehandelte Gravide:</u>						
Wes.	6,9	6,7	4,1	35,3	36,9	25,8
Jän.	13,4	10,7	5,0	70,6	29,7	20,1
Hüb.	11,9	8,2	3,4	50,2	29,5	17,2
Bun.	12,8	3,6	3,0	49,8	32,8	25,4
Neu.	12,5	8,9	5,0	67,0	33,6	29,5
Schwa.	11,0	4,1	3,5	53,1	35,7	21,8
Hah.	6,7	4,0	4,1	53,5	38,7	16,4
Goh.	4,1	3,0	3,1	42,5	35,6	19,7
Ram.	4,3	3,4	3,5	34,6	19,7	20,1
Stra.	15,9	6,7	5,3	38,8	31,5	16,5
Poh.	6,4	2,1	1,8	51,8	29,7	19,2
Klo.	8,9	5,0	5,2	35,6	20,5	15,9
Ros.	3,8	1,5	1,3	64,3	58,4	31,2
Kra.	18,0	6,4	6,0	62,0	41,2	22,0
Ric.	7,8	6,8	3,9	48,9	24,8	22,4
Kau.	31,6	12,5	6,7	53,3	41,1	30,9
Tho.	7,9	2,3	2,9	49,4	36,0	25,3
Schmi.	9,1	4,1	3,9	31,3	13,5	12,9
Tsa.	14,8	4,4	4,1	47,2	22,3	18,8
Gro.	12,5	5,3	4,0	41,3	28,5	24,3
Kno.	11,8	5,4	2,8	38,1	29,2	25,1
Wie.	10,2	2,7	2,5	38,1	31,3	29,6
Rüd.	6,9	4,5	4,1	26,6	25,2	20,5
<u>Behandelte Gravide:</u>						
Fal.	11,0	11,5	20,2	36,2	45,3	36,0
Reh.	5,4	7,6	21,5	53,0	37,8	44,3
Dil.	14,7	31,0	30,0	44,2	41,7	45,5
Süß.	13,8	18,6	22,7	56,4	51,1	44,4
Dör.	9,6	13,9	19,8	45,8	29,5	38,1
Möl.	8,4	12,1	15,0	54,9	54,3	51,4
Wöl.	13,9	11,2	24,9	38,5	50,5	44,8
Schmo.	13,3	13,5	19,7	54,1	44,9	49,4
Wen.	3,5	7,1	19,1	42,8	36,7	39,7
Schu.	13,7	14,1	21,3	26,8	25,3	30,5
Col.	3,8	18,8	21,9	57,2	48,4	59,4
Tes.	7,6	29,4	35,1	37,7	36,5	42,0
Kin.	9,8	16,9	25,3	27,8	44,1	43,1
Lin.	5,8	6,1	17,5	33,1	50,6	55,7
Her.	12,8	33,4	35,7	42,2	42,7	69,2
Men.	8,7	27,0	32,5	28,1	45,6	73,5

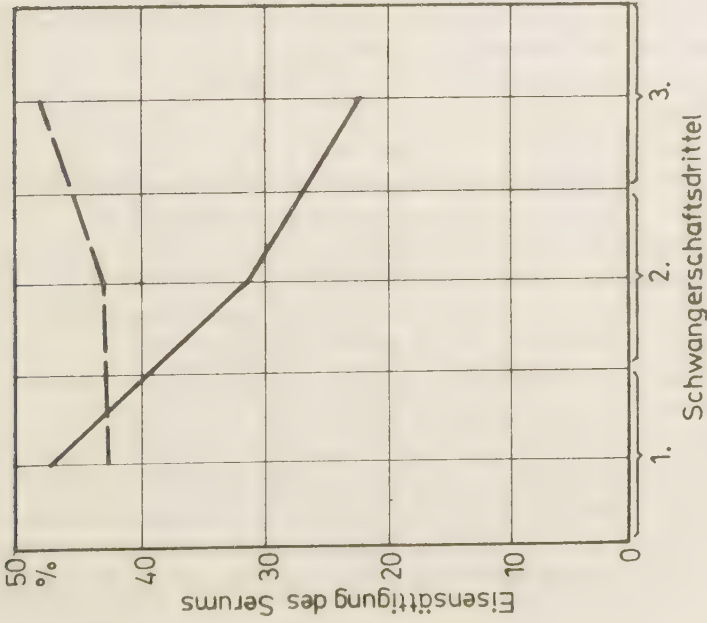


Abbildung 8: Eisensättigung in der Schwangerschaft (— unbehandelt, - - - behandelt; vgl. Tab. 9)

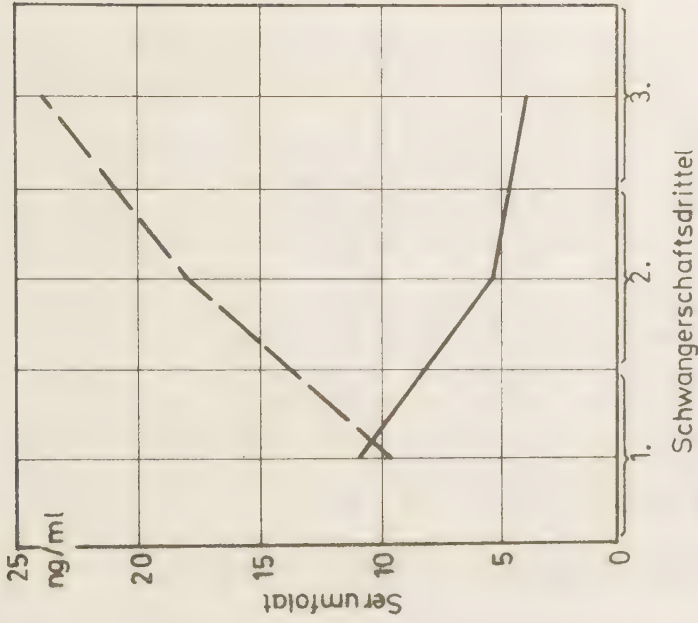


Abbildung 9: Serumfolat in der Schwangerschaft (wie Abb. 8; Daten vgl. Tab. 9)

zur Gerinnung belassen und dann mit 2000 UpM das Serum vom Blutkuchen getrennt. 6 nicht-trächtige Weibchen wurden als Kontrollen verwendet.

Die Ergebnisse (aus Doppelbestimmungen) sind in Tabelle und Abbildung 10 dargestellt. Der geringe Umfang der Tiergruppe erlaubt keine gesicherten Aussagen, obwohl bei einem Vergleich der Mittelwerte der Kontrollen ($18,1 \pm 0,1$ ng Folat/ml Serum, $n = 6$) mit dem Mittelwert aller trächtigen Tiere (Tag 10 - 20) von $14,4 \pm 0,6$ ng Folat/ml Serum ($n = 18$) mit $P \text{ ca. } 0,0005$ statistische Signifikanz auftritt. Die Kontrollwerte um 18 ng/ml entsprechen den bei CHANARIN et al. (1969) mitgeteilten Zahlen, die durchschnittliche Abnahme um 3,7 ng Folat/ml Serum = 20 % entspricht einer Abnahme, die bei Ratten nach etwa einwöchigem Folatentzug im Futter auftritt.

3.3 Serumfolat unter kontrazeptiver Medikation

Beziehungen zwischen hormonalen Kontrazeptiva und absinkenden Folatspiegeln im Serum werden von den verschiedenen Untersuchern entweder grundsätzlich bejaht oder verneint; es liegen bisher nur wenige Publikationen vor (vgl. Abschnitt 1.).

93 Frauen, die entweder mindestens 6 Monate keine "Antibabypille" eingenommen hatten oder die das erste Mal diese Art der Kontrazeption anwenden wollten, wurden aus dem Patientengut der Kontrazeptions-Sprechstunde von J. NEVINNY-STICKEL in der Frauenklinik Charlottenburg der Freien Universität Berlin in die Folat- und Eisenuntersuchungen einbezogen. Die erste Untersuchung erfolgte (unbehandelt) bei der Aufnahme, die zweite nach 6, die dritte nach 9 Monaten kontrazeptiver Therapie. Zur Anwendung als Kontrazeptivum gelangten mehrere Präparate, doch erhielt die größte Gruppe ($n = 61$) ein Präparat mit alleiniger Gestagenkomponente (2,5 mg Norethisteron-acetat). Von den 61 Patientinnen dieser Gruppe sind zwei durch Verzug aus Berlin ausgeschieden, eine weitere Probandin muß-

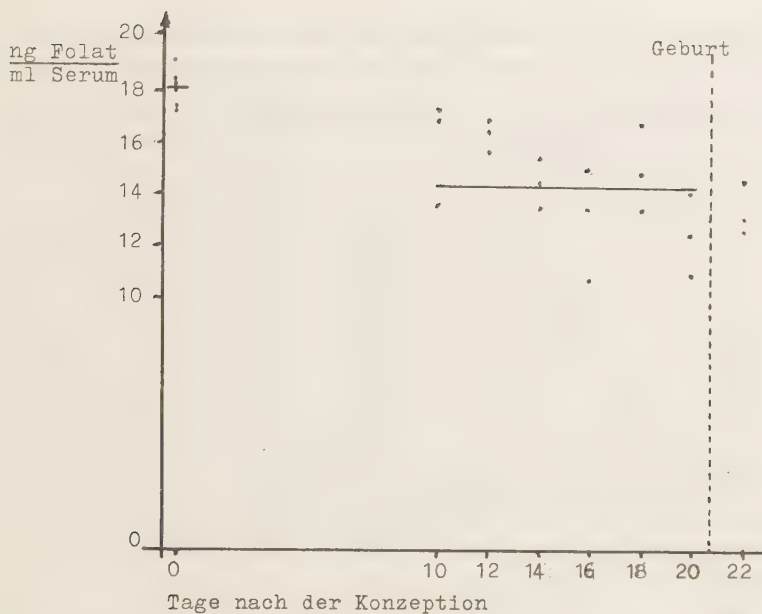


Abbildung 10: Veränderungen des Serumfolats während der Schwangerschaft von Wistarratten (SW 69 Paderborn)

Tabelle 10: Serumfolat bei trächtigen Wistarratten (SW 69 Paderborn)

Tag nach der Konzeption	ng Folat/ml Serum			
0	17,2	17,4	18,0	M = 18,1
	18,3	18,5	19,2	
10	13,4	16,7	17,2	M = 14,4
12	14,6	16,4	16,8	
14	13,4	14,6	15,4	
16	10,6	13,6	14,8	
18	13,4	15,0	16,8	
20	10,8	12,6	14,0	
22	12,6	13,1	14,5	
Einzelwerte aus Doppelbestimmungen				

te nach Einnahme eines folathaltigen Multivitaminpräparates aus der Gruppe genommen werden. Das mittlere Alter der Frauen liegt zum Beginn der Untersuchung bei 32 Jahren. Die Ergebnisse für die erste und zweite Untersuchung sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Bei starker Streuung der Einzelwerte sind die Mittelwerte von $10,6 \pm 0,6$ ng Folat/ml Serum bei Beginn der Untersuchung und von $8,4 \pm 0,5$ ng Folat/ml Serum nach sechsmonatiger Kontrazeption mit P ca. 0,005 statistisch signifikant unterschieden. Bis auf wenige Ausnahmen (7 von 58) nimmt dabei das Serumfolat um mehr als 10 %, durchschnittlich jedoch um etwa 20 % der Ausgangswerte ab.

Die Untersuchung ist erst Ende 1972 abgeschlossen und soll dann nach Vergleich mit hämatologischen und gynäkologisch-internistischen Befunden veröffentlicht werden (ROETZ & NEVINNY-STICKEL, in Vorbereitung).

4. Zellveränderungen als Parameter eines Folatmangels

Der unzweifelhaft bestehende Zusammenhang zwischen DNS-Biosynthese und Folatfunktion (vgl. Abschnitt 1.) über die Kette Folat - Dihydrofolatreduktase - Thymidylatsynthetase läßt im cytologischen Bereich bei alimentärem wie induziertem Folatmangel Strukturveränderungen im Zellkern und im cytoplasmatischen Apparat der Proteinbiosynthese erwarten. Derartige Veränderungen sollten sich bei schnell wachsenden (teilenden) Geweben und Zellen am ehesten und deutlichsten manifestieren. Darüberhinaus sollten sich auch Strukturveränderungen in den Mitochondrien auffinden lassen, evtl. im Gefolge des gestörten mitochondrien-eigenen Proteinbiosynthese-Apparates. Nach SIVA SANKAR et al. (1969) ist zwar der Hauptteil radioaktiv-markierten Pteroylglutamates in der Mäuseleber im Zellsaft (64 %), bemerkenswerte Anteile jedoch mit 20 % und 14 % auch in den Zellkernen und Mitochondrien lokalisiert. Die mit zunehmendem Zeitabstand zur Applikation ansteigende Aufnahme von PteGlu durch die Mitochondrien läßt diese Autoren einen Zusammenhang zwischen Folat und Elektronentransport annehmen, der auch von NETZLOFF (1967; NETZLOFF & KAPLAN 1969) für den Effekt von 9-Methyl-PteGlu auf Embryonalzellen diskutiert wird.

4.1. Hypersegmentierung von Leukozytenkernen

Der Zusammenhang zwischen Megaloblasten im Knochenmark und einer megaloblastischen Anämie mit Folatmangel (mit und ohne Vitamin B₁₂-Mangel) ist wohl eindeutig geklärt (CHANARIN 1969), nicht zuletzt durch die mit Folattherapie erzielten Remissionen. Zusammenhänge zwischen Riesen-zellen im Knochenmark und Proteinmangel (in Kombination mit Folat-/B₁₂-Mangel) werden gleichfalls erörtert (z.B. SPECTOR & METZ 1966). Im Zusammenhang mit der Me-

galoblastenbildung werden von einigen Autoren Veränderungen an den Zellkernen festgestellt. Bei einer mit dem Folatantagonisten Pyrimethamin ausgelösten Megaloblastenanämie fanden BOTTURA & COUTINHO (1968) an 38 % der untersuchten Metaphasen im Knochenmark Chromosomenbrüche und -Fragmentierungen und diskutieren Zusammenhänge zwischen Megaloblastenbildung und Malignisierung. Im Gefolge dieses Falles wurden auch hypersegmentierte Leukozyten gesehen. Einen leichten Anstieg von Fragmentierungen, diskontinuierlichen Chromosomen, Translokationen und Brüchen beobachteten KAUNG & SWARTZENDRUBER (1969) in den peripheren Leukozyten von Lungencarcinom-Patienten, die mit Methotrexat oder auch mit Cyclophosphamid + Streptonigrin behandelt wurden. Zifferblattähnliche Chromatinanordnungen in den Zellkernen während der Entstehung von Megaloblasten werden von KASS (1968) beschrieben; hierbei ist das randständige Chromatin fest an die Kernmembran gebunden und ermöglicht so eine nach dem Kerninneren fortschreitende Ausrichtung des zentralen Chromatins. Die Bildung von Megaloblasten, von (mitose-arretierten ?) Riesenzellen mit besonders großem Zellkern, ist nicht auf das Knochenmark beschränkt. An Cervix uteri und Vagina finden KITAY & BUDDWENTZ (1969) bei 80 % aller Schwangeren mit erniedrigten Serumfolatspiegeln Chromatinveränderungen und ein fein-vakuolisiertes Cytoplasma in vergrößerten Zellen, beschreibt VAN NIEKERK (1966) in vergrößerten Zellen gleichfalls ein fein-vakuolisiertes Cytoplasma und beobachtet KLAUS (1971) bei alimentärem Folatmangel Zellvergrößerungen mit Kerneinfaltungen, Kernvergrößerungen und dem Auftreten von Doppelkernen. Am sehr stark regenerierenden Dünndarm der Maus finden MILLINGTON et al. (1969) nach toxischer Aminopterin-Dosierung jedoch nur Epitheldegenerationen.

Als wertvolles und sicheres Diagnostikum eines alimentären Folatmangels beschreiben fast alle Autoren, die sich mit dem Problem Folatmangel und Gravidität beschäftigen, das Auftreten neutrophiler Leukozyten mit hypersegmentierten Zellkernen (5 und mehr Segmente/Kern). Experimentell beim Menschen hat HERBERT (1962) nach etwa 7 Wochen Folatmangel

das Auftreten dieser Zellen im peripheren Blut beschrieben. KITAY et al. (1969) und HIBBARD & HIBBARD (1971) haben erst kürzlich positive Korrelationen zwischen erniedrigtem Serum- und Erythrozytenfolat, positiven FIGLU-Tests und megaloblastischem Knochenmark sowie den hypersegmentierten Neutrophilen mitgeteilt. SIDDIQUI et al. (1970) beobachteten diese Zellen auch bei Patienten mit Nierenfunktionsstörungen, führen ihr Auftreten aber auch auf einen Folatmangel zurück. Über die Art der Entstehung dieser Hypersegmentierung ist nichts bekannt. Bei der Analyse des Methotrexat-Effektes an der Rattendecidua haben wir (ROETZ et al. 1972, unveröff.) Bilder erhalten, die einen Zusammenhang mit der Hypersegmentierung anzudeuten scheinen.

4.2. Methotrexateffekte an der Rattendecidua.

KOIDE et al. (1971) beschreiben an 8 - 12 Wochen altem, anlässlich artefizieller Aborte gewonnenen menschlichen Plazentamaterials, das in Hamsterbackentaschen implantiert wurde, nach Behandlung der Tiere mit Methotrexat sistierendes Wachstum und cytotoxische Effekte. Untersuchungen über submikroskopische Veränderungen an Embryonalgewebe nach Folatantagonisten sind kaum bekannt. JOHNSON et al. (1963) geben Long Evans-Ratten an Tag 8 - 10 der Trächtigkeit in folat-freiem Futter 10 mg-% 9-Methyl-PteGlu und brechen diese Applikation vom Tag 10 bis zur Schnittentbindung durch eine mit PteGlu angereicherte Diät ab. Am 13. Trächtigkeitstag waren etwa 100 % der Embryonen abgestorben. Die Embryonen an Tag 9 - 9.5 zeigten keine cytologischen Unterschiede zu Kontrolltieren, die Embryonen von Tag 10 an jedoch bei retardiertem Wachstum und verzögerter Entwicklung stark abgeschwächte Mitoseaktivitäten besonders im Neuralgewebe. Mit zunehmendem Alter der Tiere nahmen diese Effekte zu mit einer hauptsächlich Lokalisation im kranialen Bereich. Die Plazenten waren bis zum Tag 12/13 normal, dann traten Vakuolen und Pyknosen der Riesenzellen aus der Verbindungsstelle (junctional zone) zwischen Embryo und Decidua auf. Die

Verfasser nehmen als primären Angriffsort des 9-Methyl-PteGlu den Embryo an. In weiteren Versuchen (JOHNSON 1964) erhielten die Tiere an den Tagen 8 - 9 mit dem Futter 20 mg-% 9-Methyl-PteGlu, die Embryonen wurden am Tag 10 schnittentbunden. In den embryonalen Geweben war die Zahl der Mitosen um ca. $2/3$ reduziert, die Zahl fixierter Metaphaseplatten war erhöht und die histochemisch nachgewiesene RNS sowie die in elektronenmikroskopischen Abbildungen untersuchte Zahl der Ribosomen waren vermindert.

In Versuchsreihen des Pharmakologischen Institutes der Freien Universität Berlin (MERKER, KÖHLER u.a., unveröff.) wird der Einfluß des starken Folatantagonisten Methotrexat auf die Frühentwicklung der Ratte untersucht. Hierbei wurden folgende Resultate registriert:

Dosen von einmal intraperitoneal 0,5 - 0,9 mg Methotrexat pro kg Körpergewicht sind bei Wistarratten ohne besondere Wirkung auf die Embryonen, die überleben und nur eine geringgradige Retardierung im Wachstum des Skeletts zeigen. Eine einmalige i.p. Dosis von 1,2 mg Methotrexat/kg Körpergewicht führt jedoch vor Tag 9^{*} zu vollständigem Absterben und zur Resorption der Früchte, am Tag 10 binnen ca. 48 Stunden zu fast vollständigem Absterben und zur Abortierung der Früchte, nach Tag 12 jedoch zum Auftreten starker intrauteriner Blutungen und Fruchttod, wobei die Embryonen in den Blutungen "ertrunken" schienen.

In einem gezielten Versuch über diese zeit- und dosis-abhängigen Effekte des Methotrexats sollte der Wirkungsort dieser Substanz elektronenmikroskopisch lokalisiert werden.

Material und Methode: Wistarratten SW 69 Paderborn erhielten am Tag 10 einmal 1,2 mg Methotrexat/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Anlagen (Embryonen mit Decidua/Plazenta) wurden am Tag 12 entnommen, in modifizierter KARNOFSKY-Lösung und 1%ig. OsO₄/Kakodylat fixiert und in Mikropal eingebettet. Die Ultradünnschnitte wurden mit LKB-Ultroton, die Aufnahmen mit dem Siemens-

*Wir setzen als Tag "Null" der Entwicklung den Tag an, an dem bei einem umgekehrten Hell/Dunkel-Rhythmus die Kopulation in den frühen Morgenstunden erfolgt ist.

Elmiskop I angefertigt.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11 - 20 des elektronenmikroskopischen Anhangs dokumentiert. Im embryonalen Gewebe werden nur geringe und unspezifische Wirkungen des Methotrexat entdeckt wie vereinzelte Nekrosezonen im Bereich des neuralen Gewebes (Abb. 11), Mitochondrienschwellung und Fehlen von Polysomen (Abb. 11, 12). Dagegen zeigt die Decidua, die den Embryo gegen den mütterlichen Organismus abgrenzt und in der prä-plazentaren Phase entscheidende Funktionen in der Versorgung des Embryos mit Nähr- und Wirk(?)stoffen hat (MERKER & VILLEGAS 1970), massive Veränderungen des Zellkerns und des cytoplasmatischen Proteinsyntheseapparates. Abbildung 13 zeigt einen normalen Zellkern der Decidua mit kräftig ausgebildetem großen Nukleolus und intensivem endoplasmatischen Retikulum als Ausdruck einer intensiven Proteinbiosynthese. Unter Methotrexat kommt es in den decidualen Zellkernen zu einer Segregation der Nukleoli und zur Verdichtung der DNS (Pyknose) (Abb. 14 - 16), diese Effekte treten auch an den Kernen der Riesenzellen (Abb. 20) aus der Verbindungszone zwischen Decidua und Embryo auf. Daneben werden in den Kernen perichromatine Granula beobachtet, deren Ursache und Natur unbekannt ist, die aber nur im Gefolge pathologischer Veränderungen auftreten (Abb. 16). In Zellen mit Kernteilungsstadien fällt ein Persistieren der de norma aufgelösten Kernmembran auf (Abb. 17), die dem Chromatin verhaftet scheint (Abb. 18) und zu einer Septen- bis Kammerbildung (Abb. 19) des Chromatins führt. Diese Septierung = Segmentierung hat eine frappante Ähnlichkeit mit der Hypersegmentierung der neutrophilen Leukozyten bei alimentärem Folatmangel. Wie es zur Auslösung dieses Methotrexat-Effektes bzw. der Wirkung des Nahrungsfolatmangels kommt ist gänzlich unbekannt. Obwohl dem Folat nur eine indirekte Beteiligung für die Synthese von Membransubstanzen zugeschrieben wird (BLAKLEY 1969), könnte in teilungsaktiven Organen oder Geweben diese Wirkung vielleicht doch zum Ausdruck kommen.

Die morphologischen Befunde an Embryo und Decidua lassen sich mit biochemischen Untersuchungen über die Aktivität der Dihydrofolatreduktase korrelieren. Das Verhältnis der Zellzahlen von Decidua/Embryo beträgt an Tag 10 etwa 10000/1. Mit dem mütterlichen Blut gelangt Methotrexat zunächst in die Decidua und wird hier durch die rezeptor-ähnliche Dihydrofolatreduktase gebunden, wobei eine Aktivitätshemmung um etwa 90 % und keine Kompensation durch Neusynthese eintritt. Bei der verwendeten embryotoxischen Dosierung gelangt Methotrexat auch in den Embryo - die Dihydrofolatreduktase erscheint hier zunächst ohne jede Hemmung. Neben einer im Vergleich mit Kontrollen nahezu 100 %igen Aktivität des Enzyms lassen sich jedoch weitere 30 % gehemmten Enzyms nachweisen, d.h. es hat nach Methotrexat im Embryo eine Kompensierung durch Neusynthese stattgefunden. Die Decidua wirkt hier als funktionelle Barriere. Durch ihren Zusammenbruch wird der Embryo nicht mehr ausreichend mit decidualen Nähr- und Wirkstoffen versorgt und stirbt ab. A. DYBAN (1972, Diskussionsbemerkung zu ROETZ et al.) konnte die vorwiegend deciduale Schädigung nach Methotrexat aus Beobachtungen an histologischen Schnitten bestätigen. Die Abweichungen zu den Befunden JOHNSON's lassen sich einmal auf die Verwendung des sehr viel schwächeren Dihydrofolatreduktase-Inhibitors 9-Methyl-PteGlu und zusätzlich durch die nicht vergleichbare Applikationsart und Dosierung erklären.

Der biochemischen Analyse sind durch Materialmangel in frühembryonalen Stadien Grenzen gesetzt. Ein quantifizierbarer histochemischer Nachweis der Dihydrofolatreduktase steht bisher aus. Die Methode von GUNLACK et al. (1968) hat sich als ungeeignet erwiesen (REPIN, pers. Mitt. 1972), eine kürzlich erschienene Technik von ONICESCU et al. (1970) scheint geeignet zu sein, wie Vorversuche ergeben haben.

5. Diskussion

5.1. Veränderungen des Serumfolatspiegels in der Gravidität

Neuere Angaben über die Frequenz von stark reduziertem Serumfolat in der Schwangerschaft liegen zwischen 18 und 75 %, stark reduziertes Erythrozytenfolat wird bei 24 - 31 % und positive FIGLU-Tests werden bei 16 - 31 % aller schwangeren Frauen nachgewiesen (Literatur vgl. ROETZ & MERKER 1972). Untersuchungen an Längsschnittserien, die entsprechen prospektiven Untersuchungen, liegen kaum vor, schon gar nicht aus dem Gebiet der Bundesrepublik einschließlich Westberlins. Von den hier mitgeteilten 23 unbehandelten Schwangeren zeigten alle eine Abnahme des Serumfolats, bei 5 (ca. 20 %) wurden Werte unter 3 ng/ml Serum im Schwangerschaftsverlauf gemessen, wobei dieser Wert in den letzten Jahren von allen Untersuchern wegen seiner eindeutigen Korrelation zu pathologischen Folatmangelzuständen als kritische untere Grenze bezeichnet wird.

Die Ausgangswerte im ersten Schwangerschaftsdrittel von 10,7 (n = 23) bzw. 9,7 (n = 16) korrespondieren mit den durchschnittlichen Serumspiegeln von $10,6 \pm 0,6$ ng Folat/ml (n = 58) bei den allerdings älteren Patientinnen, die anschließend mit Kontrazeptiva behandelt wurden. Die Serumfolatwerte nehmen durch die gesamte Gravidität hin ab, am eindeutigsten jedoch zwischen dem ersten und zweiten Drittel. Inzwischen ist eine erste Folatuntersuchung an westdeutschen Schwangeren aus dem Einzugsgebiet der Fuldaer Klinik erschienen (GÖLTNER et al. 1972). Die Autoren haben dabei unter Verwendung einer älteren Folatbestimmungsmethode aus dem Jahre 1961 von WATERS und MOLLIN, die steriles Arbeiten verlangt, eine Querschnittuntersuchung durchgeführt, deren Zahlen, aber nicht deren Folgerungen, sich eindeutig von den hier mitgeteilten Werten unterscheiden. Bei statistisch signifikanten Unterschieden zwischen Nichtschwangeren (n = 100, 14,39 ng/ml) werden in den Schwangerschaftsdritteln Werte von 12,93 (n = 70), 12,83 (n = 80) und 12,05 (n = 100) berichtet. GÖLTNER et al. sehen im Gegensatz zu allen

neueren Untersuchungen bereits Werte unter 7 ng Folat/ml Serum als Ausdruck eines allerdings leichten Folatmangels an. Sie setzen Werte zwischen 7 und 30 ng/ml als Normalbereich ein, schreiben jedoch andererseits: "Der Folsäuregehalt des Blutplasmas lag bei den Schwangeren deutlich unter dem Normbereich". Die Ursache für die so wenig veränderten Folatwerte der Fuldaer Frauen sind letztlich unbekannt, sie könnte tatsächlich mit der Herkunft der Patientinnen zu tun haben, doch scheinen GÖLTNER et al. auch Probleme mit der von ihnen verwendeten veralteten Methode gehabt zu haben ("Folsäurebestimmungen ... sind für die Routinediagnostik zu umständlich."), einer Methode, die von WATERS und MOLLIN seit 1961 mehrfach verbessert worden ist.

Trotz individueller und physiologischer Schwankungsbreiten kommen jeder, in Zufuhr und Verbrauch ausgeglichenen Vitaminbilanz auch Serumkonzentrationen des betreffenden Vitamins (oder Provitamins) zu, die diese ausgeglichene Bilanz beschreiben. Werden diese Konzentrationen unterschritten, liegt entweder ein Mehrverbrauch, eine mangelnde Zufuhr oder ein Mehrverbrauch bei mangelnder Zufuhr vor. Ein verminderter Serumfolatspiegel kann also diese drei "Mangel"-zustände beschreiben. Unabhängig von diesen drei Möglichkeiten geben jedoch Serumwerte, die in einem Bereich mit sicheren pathologischen Korrelationen liegen (hier Werte unter 3 ng Folat/ml) das Recht, von einem Folatmangel zu sprechen. Eine Tendenz zur Abnahme, zu diesem kritischen Wert hin bedeutet danach eine Tendenz zu einer Mangelsituation. Diese Überlegungen müssen jeder kritischen Diskussion (FORSHAW & HARWOOD 1971) über den diagnostischen Wert von Untersuchungen des Serumfolatspiegels zugrundegelegt werden. Werden weiter unter veränderten physiologischen Bedingungen, etwa in der Schwangerschaft, Tendenzen zur Unterschreitung solcher kritischen Werte beobachtet, leitet sich bereits daraus die Pflicht zu einer Prophylaxe ab.

5.2. Veränderungen des Serumfolatspiegels unter dem Einfluß von Kontrazeptiva

Die reduzierten Folatspiegel in der Schwangerschaft werden allgemein primär mit dem Mehrbedarf des wachsenden Uterus und Embryo und der sich entwickelnden Plazenta erklärt. Zwischen Steroidstoffwechsel und Folaten existieren jedoch auch direkte Beziehungen, z.B. in der Beteiligung von reduziertem PteGlu an Steroidhydroxylierungen (Reaktion b), Seite 12).

Ältere Untersuchungen haben sich mit dem Problem geschlechtsspezifischer Reaktionen auf Folatantagonisten beschränkt. So vertragen nach TAYLOR & CARMICHAEL (1949) männliche Mäuse sehr viel größere Maximaldosen Folsäure als weibliche Tiere. HIGGINS et al. (1950) beschreiben nach Aminopterin bei Ratten eine Nebennierenhyperplasie, der entsprechende Steigerungen der Harnexkretion von Corticosteroiden parallel gehen. GOLDSMITH et al. (1949) und GELFANT et al. (1955) setzen die Hemmung des Frosch-Oviduktwachstums bzw. des Rattenuteruswachstums nach Oestrogenen durch Aminopterin nicht in einen direkten Zusammenhang, sondern nehmen Interferenzen in der DNS-Synthese an, wobei das Aminopterin durch eine mangelnde Bereitstellung von Thymidin die oestrogen-induzierten Mitosen des Organwachstums verhindert. Einen mehr direkten Antagonismus zwischen Aminopterin und Progesteron beobachteten VELARDO & HISAW (1952) an ovariectomierten Mäusen, bei denen in ligierten Uterussegmenten die zu einem biologischen Progesteron-Nachweis untersuchten Zellveränderungen (HOOKER-FORBES-Reaktion) nach Aminopterin ausbleiben. Eine sehr interessante Beobachtung teilen WEINTRAUB et al. (1950) mit. Nach ihnen ist die Aminopterintoxizität bei allen Tieren ohne Testosteron, d.h. bei Weibchen, kastrierten Männchen und nicht-erwachsenen Männchen deutlich erhöht. Vor kurzem haben nun TOLOMELLI et al. (1972) und ROVINETTI et al. (1972) über direkte Wechselwirkungen zwischen Testosteron und dem Folatstoffwechsel berichtet. Sie finden bei kastrierten Ratten eine gehemmte Folataktivierung, gemessen an der Abnahme des mit *P. cerevisiae* im Harn ausgeschiedenen reduzierten Folats, dessen Werte nach Testosteron nor-

malisiert sind. Weiter werden durch Kastration bzw. Testosteronsubstitution nach Kastration einige Enzyme des Folatstoffwechsels organspezifisch in ihren Aktivitäten beeinflusst; die Autoren diskutieren Kontrollfunktionen des androgenen Hormons Testosteron für die Dihydrofolatreduktase, die 5,10-Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase und die 10-Formyltetrahydrofolat-Synthetase. Diese Beobachtungen lassen generelle Beziehungen zwischen Steroidhormonen und Folaten erwarten, die bei Steroidlangzeitapplikation, wie etwa bei der hormonalen Kontrazeption, zum Ausdruck kommen können.

Die bislang publizierten Veröffentlichungen über den Einfluß von hormonalen Kontrazeptiva bieten ein sehr uneinheitliches Bild, nicht zuletzt wegen der sehr verschiedenen Materialsammlung. Prospektive Längsschnittserien sind bislang nicht publiziert worden, meist wurden Folatmangelparameter bei Frauen mit längerer Kontrazeption mit den Frequenzen dieser Größen an ähnlichen Patientengruppen ohne Kontrazeption verglichen. Um hier Zufallsauswahlen auszuschließen müssen sehr große Kollektive verglichen werden. Dies ist in keiner der publizierten Studien geschehen. LUHBY et al. (1971) haben eine prospektive Untersuchung an etwa 60 Frauen angekündigt. STEPHENS et al. (1972) haben die bislang ausführlichste, auch experimentelle Untersuchung vorgelegt und kommen zu negativen Resultaten. Sie finden z.B. keine Zyklusabhängigkeit bei unbehandelten Frauen und bei Frauen mit dreimonatiger Kontrazeption mit verschiedenen Präparaten, die aus einer Kombination Oestrogen + Gestagen bestehen, stellen sie ebenfalls keine "Zyklusabhängigkeit" fest. Sie interpretieren diese negativen Resultate mit dem Fehlen einer Beziehung zwischen hormonalen Kontrazeptiva und Folatstoffwechsel. Die eigenen Resultate weisen jedoch nach sechsmonatiger täglicher Applikation von 2,5 mg Norethisteron-acetat eine signifikante Abnahme des Serumfolats nach. Sollte sich diese Entwicklung fortsetzen, und die statistische Aufschlüsselung des von SHOJANIA et al. (1971) sowie teilweise bereits vorgenommene Folgeuntersuchungen bestätigen das, dann muß auch bei Langzeitapplikation (synthetischer) Gestagene mit dem vermehrten Auftreten von Folatmangelzuständen gerechnet werden, gleichgültig, ob dies durch eine direkte Beziehung oder durch die hormonale Umstellung des Körpers geschieht.

6. Zusammenfassung

- 1.) Nach Diskussion der heutigen Kenntnisse des Folatstoffwechsels und der Folatfunktionen, besonders im Hinblick auf die Nukleinsäuresynthese, werden das Problem des Folatmangels und seiner Parameter und speziell die Zusammenhänge zwischen alimentärem bzw. induziertem Folatmangel und Entwicklungsstörungen besprochen.
- 2.) Eine nach CHANARIN modifizierte Bestimmungsmethode von Folaten in Serum und Geweben mit einer chloramphenicol-resistenten Mutanten NCIB 10463 von *Lactobacillus casei* wird detailliert beschrieben. Einzelne Bedingungen dieser Methode werden experimentell überprüft, darunter auch der Einfluß von Thymidin. Das Verfahren ist als Routinemethode zur Folatbestimmung gut geeignet.
- 3.) Beischwangeren Frauen nehmen, dargestellt an Teilergebnissen einer Längsschnittserie, die Folatspiegel von durchschnittlich 10,7 ng/ml Serum im ersten Schwangerschaftsdrittel über 5,3 ng/ml im zweiten bis auf 3,9 ng Folat/ml Serum im letzten Schwangerschaftsdrittel ab. Bei etwa 20 % der Schwangeren ist bei den heutigen Lebensbedingungen die Entwicklung eines Folatmangels (ausgedrückt durch Serumfolatwerte unter 3 ng/ml) möglich. Bei einer Blinisubstitution Schwangerer mit 350 µg Folsäure + 105 mg Eisen (als Sulfat) bleibt die gleichfalls in der Gravidität absinkende Eisensättigung des Serums konstant, während die Folatwerte ansteigen.
- 4.) Während der Trächtigkeit von Wistarratten nimmt das Serumfolat von Werten bei 18 ng/ml um etwa 20 % ab.
- 5.) Bei 58 für 6 Monate mit 2,5 mg Norethisteron-acetat aus kontrazeptiver Indikation behandelten Frauen fallen die Serumfolatspiegel, fast ohne Ausnahme, von $10,6 \pm 0,6$ auf $8,4 \pm 0,5$ ng/ml ab.
- 6.) Die Bedeutung der in der Schwangerschaft und nach hormonaler Kontrazeption erniedrigten Serumfolatwerte wird diskutiert.
- 7.) Die embryotoxische Wirkung des Folatantagonisten Methotrexat in der prä-plazentaren Phase der Ratte wird mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen in der Decidua lokalisiert. Hierbei zeigen die Zellkerne Veränderungen, die der Hypersegmentierung neutrophiler Leukozytenkerne bei alimentärem Folatmangel gleichen.

7. Literaturverzeichnis

- ADAMS, R.L.P.: The effect of endogenous pools of thymidylate on the apparent rate of DNA synthesis. *Exp. Cell Res.* 56, 55-58 (1969)
- ALLFREY, V., L.J. TEPLY, C. GEFFEN & C.G. KING: A fluorometric method for the determination of pteroylglutamic acid. *J. biol. Chem.* 178, 465-81 (1949)
- ALPERIN, J.B., M.E. HAGGARD & W.J. MCGANITY: Folic acid, pregnancy, and abruptio placentae. *Amer. J. clin. Nutr.* 22, 1354-61 (1969)
- ANDERSON, B.B. & J.D. COWAN: Effect of light on the *Lactobacillus casei* microbiological assay. *J. clin. Path.* 21, 85-87 (1968)
- ANDREWS, M.M. & B.S. SCHWEIGERT: Studies on the measurement of the folic acid and *Citrovorum* factor potencies of certain natural products. *Arch. Biochem. Biophys.* 44, 165-75 (1953)
- ANGIER, R.B., J.H. BOOTHE, B.L. HUTCHINGS, J.H. MOWAT, J. SEMB, E.L.R. STOKSTAD, Y. SUBBAROW, C.W. WALLER, D.B. COSULICH, M.J. FAHRENBACH, M.E. HULTQUIST, E. KUH, E.H. NORTHEY, D.R. SEEGER, J.P. SICKELS & J.M. SMITH jr.: Synthesis of a compound identical with the *L. casei* factor isolated from liver. *Science* 102, 227-28 (1945)
- The structure and synthesis of the liver *L. casei* factor. *Science* 103, 667-69 (1946)
- ARMSTRONG, R.C. & J.J. ELIAS: Development of embryonic rat eyes in organ culture. II. An in vitro approach to teratogenic mechanisms. *J. Embryol. exp. Morph.* 19, 407-14 (1968)
- ARMSTRONG, R.C. & I.W. MONIE: Congenital eye defects in rats following maternal folic acid deficiency during pregnancy. *J. Embryol. exp. Morph.* 16, 531-42 (1966)

- ASLING, C.W. & M.M. NELSON: Skeletal abnormalities in the rat fetus resulting from pteroylglutamic ("folic") acid deficiency during gestation. Anat. Rec. 106, 170-71 (1950)
- ASLING, C.W., M.M. NELSON, H.V. WRIGHT & H.M. EVANS: Congenital skeletal abnormalities in fetal rats resulting from maternal pteroylglutamic acid deficiency. Anat. Rec. 121, 775-799 (1955)
- ASLING, C.W., H.V. WRIGHT, H.L. DOUGHERTY, M.M. NELSON & H.M. EVANS: Palatal and facial anomalies in the offspring of rats subjected to a pteroylglutamic acid (PGA) deficiency during gestation. Anat. Rec. 121, 257 (1955)
- ASLING, C.W., M.M. NELSON, H.L. DOUGHERTY, H.V. WRIGHT & H.M. EVANS: Surg. Gynecol. Obst. 111, 19-28 (1960) The development of cleft palate resulting from maternal pteroylglutamic acid deficiency during the latter half of gestation in rats.
- BAIRD, C.D.C., M.M. NELSON, I.W. MONIE & H.M. EVANS: Congenital cardiovascular anomalies induced by pteroylglutamic acid deficiency during gestation in the rat. Circulation Res. 2, 544-54 (1954)
- BAKER, H. & H. SOBOTKA: Microbiological assay methods for vitamins. Adv. clin. Chem. 5, 175-235 (1962)
- BAKER, H., R. ERDBERG, J. PASHER & H. SOBOTKA: Study of folic acid and vitamin B₁₂ in blood and urine during normal pregnancy. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 94, 513-15 (1957)
- BAKER, H., H. ZIFFER, I. PASHER & H. SOBOTKA: A comparison of maternal and fetal folic acid and vitamin B₁₂ at parturition. Brit. med. J. 1958/1, 978-79

- BAKER, H, V. HERBERT, O. FRANK, I. PASHER, S.H. HUTNER,
L.R. WASSERMAN & H. SOBOTKA: A microbiologic method for detecting folic acid deficiency in man. Clin. Chem. 5, 275-80 (1959)
- BAKER, H., O. FRANK, I. PASHER, H. ZIFFER & H. SOBOTKA: Pantothenic acid, thiamine, and folic acid levels at parturition. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103, 321-23 (1960)
- BAKER, H., O. FRANK, H. ZIFFER, S. FEINGOLD & A.A. CINTRON-RIVERA: Reversal of folate malabsorption in tropical and non-tropical sprue by calf jejunum. Brit. med. J. 1968/3, 472-74
- BAKER, H., A.D. THOMSON, S. FEINGOLD & O. FRANK: Role of the jejunum in the absorption of folic acid and its polyglutamates. Amer. J. clin. Nutr. 22, 124-32 (1969)
- BAKER, H., O. FRANK, A.D. THOMSON & S. FEINGOLD: Vitamin distribution in red blood cells, plasma, and other body fluids. Amer. J. clin. Nutr. 22, 1469-75 (1969)
- BAKERMAN, H.A.: A method for measuring activity of tetrahydrofolic acid and other labile reduced folic acid derivatives. Anal. Biochem. 2, 558-67 (1961)
- BALIS, M.E., D.H. LEVIN, G.B. BROWN, G.B. ELION, H. VANDERWERFF & G.H. HITCHINGS: The utilization of purine ribotides by Lactobacillus casei. J. biol. Chem. 200, 1-6 (1953)
- BANERJEE, S. & A.R. DRAVID: Histochemical and histological studies in normal and aminopterin-treated rats. Indian J. med. Res. 47, 46-50 (1959) (Exc. Med., Sect. I, 14, 417 -1960-)
- BARANOV, V.S.: Peculiarities of the harmful effect of aminopterin on various stages of embryogenesis in rats. Dokl. Akad. Nauk SSSR 163, 1032-35 (1965, russ.) - (exc. Med. Sect. I, 20, 888 -1966-)

- BASERGA, R., D. THATCHER & D. MARZI: Cell proliferation in mouse kidney after a single injection of folic acid. *Labor. Invest.* 19, 92-96 (1968)
- BAUMSLAG, N., T. EDELSTEIN & J. METZ: Reduction of incidence of prematurity by folic acid supplementation in pregnancy. *Brit. med. J.* 1970/1, 16-17
- BAUGH, C.M. & C.L. KRUMDIECK: Naturally occurring folates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 186, 7-28 (1971)
- BENNETT, M.C., V. BERRY, I. CHANARIN & S. ARDEMAN: The assay of folic-acid activity of liver. *J. clin. Path.* 17, 27-30 (1964)
- BERNSTEIN, L.H., S. GUTSTEIN & S.V. WEINER: Gamma glutamyl carboxypeptidase (conjugase), the folic acid-releasing enzyme of intestinal mucosa. *Amer. J. clin. Nutr.* 23, 919-25 (1970)
- BERRY, C.L.: Transient inhibition of DNA synthesis by methotrexate in the rat embryo and foetus. *J. Embryol. exp. Morph.* 26, 469-74 (1971)
- BERTINO, J.R.: The mechanism of action of the folate antagonists in man. *Cancer Res.* 23, 1286-1306 (1963)
- BERTINO, J. R. (ed.): Folate antagonists as chemotherapeutic agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 186 (1971), pp. 519
- BERTINO, J.R., P. O'BRIEN & J.L. McCULLOUGH: Inhibition of growth of leukemia cells by enzymic folate depletion. *Science* 172, 161-62 (1971)
- BIRD, A.V.: Anticonvulsant drugs and congenital abnormalities. *Lancet* 1969/1, 311
- BIRD, O.D., V.M. MCGLOHON & J.W. VAITKUS: Naturally occurring folates in the blood and liver of the rat. *Anal. Biochem.* 12, 18-35 (1965)
- BJERRE, B.: Study of the haematological effect of prophylactic folic acid medicamentation in pregnancy. *Acta obst. gyn. Scand.* 46, suppl. 7, 71-85 (1967)

- BLAKLEY, R.L.: The biochemistry of folic acid and related pteridines. Amsterdam - New York 1969, pp. 570 (Frontiers of Biol., vol. 13)
- BOTTURA, C., & V. COURTINHO: The chromosome anomalies of the megaloblastic anaemias. Blut 16, 193-99 (1967)
- BRADÉ, W., H. HERKEN, H.J. MERKER & W. DRESCHER: Funktionsstörung und Stimulation des Wachstums der Niere durch Folsäure in hoher Dosierung. Klin. Wschr. 46, 1232-33 (1968)
- BRADÉ, W., H. HERKEN & H.J. MERKER: Schädigung und Regeneration renaler Tubuluszellen nach Folsäuregabe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. 262, 228-50 (1969)
- Regeneration of renal tubular cells after lesion by temporary ischemia, folic acid, and 2.4.5-triamino-6-styrylpyrimidine. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. 266, 95-100 (1970)
- BRATTON, A.C., & E.K. MARSHALL jr.: A new coupling compound for sulfanilamide determination. J. biol. Chem. 128, 537-50 (1939)
- BRIGGS, G.M., M.R. SPIVEY, J.C. KERESZTESY & M. SILVERMAN: Activity of Citrovorum factor for the chick. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 113-15 (1952)
- BROQUIST, H.P., E.L.R. STOKSTAD, C.E. HOFFMANN, M. BELT & T.H. JUKES: Some observations on growth factors required for Leuconostoc citrovorum. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 549-552 (1949)
- BROQUIST, H.P., J.A. BROCKMAN, M.J. FAHRENBACH, E.L. STOKSTAD & T.H. JUKES: Comparative biological activity of leucovorin and pteroylglutamic acid. J. Nutr. 47, 93-103 (1952)
- BUHAC, I & J.W. FINN: Folsäuremangelzustände als Folge des langfristigen Gebrauchs peroraler kontraceptiver Mittel. Schweiz. med. Wschr. 101, 1879-81 (1971)

- BURCHALL, J.J.: Comparative biochemistry of dihydrofolate reductase. Ann. N.Y. Acad. Sci. 186, 143-152 (1971)
- BURGITO, G.R., & F. SEVERI: Folsäuremangelzustände im Kindesalter. Med. Klin. 66, 976-80 (1971)
- BUTTERWORTH jr., C.E.: Absorption and malabsorption of dietary folate. Amer. J. clin. Nutr. 21, 1121-27 (1968)
- BUTTERWORTH jr., C.E. & E. PEREZ-SANTIAGO: An evaluation of thymidine in treatment of tropical sprue. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 92, 762-63 (1956)
- BUTTERWORTH jr., C.E., R. SANTINI jr. & W.B. FROMMEYER jr.: The pteroylglutamate components of American diets as determined by chromatographic fractionation. J. clin. Invest. 42, 1020-39 (1969)
- CANTLIE, G.S.D., N.K.M. de LEEUW & L. LOWENSTEIN: Iron and folate nutrition in a group of private obstetrical patients. Amer. J. clin. Nutr. 24, 637-41 (1971)
- CHANARIN, I.: Diagnosis of folate deficiency in pregnancy. Acta obst. gyn. Scand. 46, suppl. 7, 39-46 (1967)
- Alcohol and haemopoiesis. Brit. J. Haem. 17, 515-16 (1969)
- The megaloblastic anaemias. Oxford & Edinburgh 1969, pp. 1000
- Folate deficiency in the myeloproliferative disorders. Amer. J. clin. Nutr. 23, 855-60 (1970)
- CHANARIN, I., & V. BERRY: Estimation of serum L. casei activity. J. clin. Path. 17, 111-13 (1964)
- CHANARIN, I., B.B. ANDERSON & D.L. MOLLIN: The absorption of folic acid. Brit. J. Haem. 4, 156-66 (1958)
- CHANARIN, I., M. HUTCHINSON, A. McLEAN & M. MOULE: Hepatic folate in man. Brit. med. J. 1966/1, 396-99

- CHANARIN, I., D. ROTHMAN, A. WARD & J. PERRY: Folate status and requirement in pregnancy. Brit. med. J. 1968/2, 390-94
- CHANARIN, I., D. ROTHMAN, J. PERRY & D. STRATFULL: Normal dietary folate, iron, and protein intake, with particular reference to pregnancy. Brit. med. J. 1968/2, 394-97
- CHANARIN, I., G.N. SMITH & V. WINCOUR: Development of folate deficiency in the rat. Brit. J. Haem. 16, 193-95 (1969)
- CHILD, J.A., B.Z. KHATTAK & J.P. KNOWLES: Macrocytosis in patients on anticonvulsant drugs. Brit. J. Haem. 16, 451-55 (1969)
- CONDIT, P.T., N.I. BERLIN & D.G. NATHAN: Studies on the folic acid vitamins. VI. The effect of amethopterin on erythropoiesis in man. Cancer 13, 245-49 (1960)
- COOPER, B.A.: Folate uptake by Lactobacillus casei. J. clin. Invest. 48, 18a (1969)
- COOPER, B.A., G.S.D. CANTLIE & L. BRUNTON: The case for folic acid supplements during pregnancy. Amer. J. clin. Nutr. 23, 848-54 (1970)
- COOPERMAN, J.M.: Microbiological assay of serum and whole blood folate activity. Amer. J. clin. Nutr. 20, 1015-24 (1967)
- Microbiological assay of serum and whole-blood folic acid activity. Amer. J. clin. Nutr. 21, 1345-46 (1968)
- COOPERMAN, J.M., & A.L. LUHBY, C.M. AVERY: Serum folic acid activity by improved $\bar{T}$. casei assay. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 536-39 (1960)
- COPENHAVER, J.H., & K.L. O'BRIEN: Separation and identification of pteroylglutamates by ion-exchange thin-layer chromatography. Anal. Biochem. 31, 454-62 (1969)
- COWAN, J.D., A.V. HOFFMANN & D.L. MOLLIN: Effect of factors other than folate on the Lactobacillus casei assay. Lancet 1966/1, 11 - 14

- COSTA, M. da, & S.P. ROTHENBERG: Identification of an immunoreactive folate in serum extracts by radioimmunoassay. *Brit. J. Haem.* 21, 121-30 (1971)
- CRAVENS, W.W., & E.E. SNELL: Reversal of aminopterin inhibition of the chick embryo with Leucostoc citrovorum factor. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 75, 43-45 (1950)
- DANIELS, E.: Embryonic neuroretinal response to methotrexate in vitro. *Anat. Rec.* 169, 304 (1971)
- DAS, K.C., & A.V. HOFFBRAND: Folate uptake by lymphocytes. *Brit. J. Haem.* 17, 613-14 (1969)
- Studies of folate uptake by phytohaemagglutinin-stimulated lymphocytes. *Brit. J. Haem.* 19(1970), 203-221
- DAVIS, R.E., D.J. NICOL & A. KELLY: An automated method for the measurement of folate activity. *J. clin. Path.* 23, 47-53 (1970)
- DAWSON, D.W., & C. GEERY: Hepatic and serum folates in patients fasting and after oral folic acid. *J. clin. Path.* 24, 129-30 (1971)
- DICKERMAN, H.W.: The role of folate coenzymes in the initiation of protein synthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 186, 70-81 (1971)
- DICKERMAN, H.W., & B.C. SMITH: Aminoacyl formylmethionyl transfer ribonucleic acid transformylase. Inhibitor studies and the reversal of the reaction. *Biochemistry* 9, 1247-55 (1970)
- DIETRICH, L.S., W.J. MONSON & C.A. ELVEHJEM: Effect of sulfasuxidine on the interrelationship of folic acid, vitamin B₁₂ and vitamin C. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 75, 130-33 (1950)
- DINNING, J.S., J.T. SIME, P.S. WORK, B. ALLEN & P.L. DAY: The metabolic conversion of folic acid and Citrovorum factor to a diazotable amine. *Arch. Biochem. Biophys.* 66, 114-19 (1957)

- DOCTOR, V.M., & J.R. COUCH: Occurrence and properties of a conjugated form of *Leuconostoc citrovorum* factor. *J. biol. Chem.* 200, 223-31 (1953)
- DOCTOR, V.M., & E. GONZALES: **Studies** on the conversion of folic acid to Citrovorum factor by developing chick embryo. *Exper. Cell Res.* 13, 116-21 (1957)
- DOUGHERTY, J.H., & T.F. DOUGHERTY: Acute effect of 4-aminopteroylglutamic acid on blood lymphocytes and the lymphatic tissue of intact and adrenalectomized mice. *J. Lab. clin. Med.* 35, 271-79 (1950)
- DUNLAP, R.B., N.G.L. HARDING & F.M. HUENNEKENS: Thymidylate synthetase and its relationship to dihydrofolate reductase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 186, 153-165 (1971)
- EAGLE, H., & G. E. FOLEY: The cytotoxic action of carcinolytic agent in tissue culture. *Amer. J. Med.* 21, 739-49 (1956)
- ECKERT, T., & N.W. DÖRR: Intermolekulare Wechselwirkungen der Folsäure mit N-Phthaloyl-DL-glutaminsäure. Ein Beitrag zur Frage der teratogenen Wirkung des Thalidomid. *Experientia* 27, 671-72 (1971)
- Editorial: Nutritional folate deficiency. *Brit. med. J.* 1968/2, 377-79
- EMERSON, D.J.: Congenital malformations due to attempted abortion with aminopterin. *Amer. J. Obst. Gyn.* 84, 356- 57 (1962)
- ERSHOFF, B.A., & H.B. McWILLIAMS: Effects of B vitamins and liver on growth of immature rats maintained at low temperature. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 75, 226-29 (1950)
- EVANS, H.M., M.M. NELSON & C.W. ASLING: Multiple congenital abnormalities resulting from acute folic acid deficiency during gestation. *Science* 114, 479 (1951)
- FLEMING, A.E., & H.P. BROQUIST: Biopterin and folic acid deficiency. *Amer. J. clin. Nutr.* 20(1967), 613-21

- FORD, J.E., G.S. KNAGGS, D.N. SALTER & K.J. SCOTT: Folate nutrition in the kid. *Brit. J. Nutr.* 27, 571-83 (1972)
- FORSHAW, J., & L. HARWOOD: Diagnostic value of the serum folate assay. *J. clin. Path.* 24, 244-49 (1971)
- FRANK, O., H. BAKER & S.H. HUTNER: Microbiological assay of serum and whole-blood folic acid activity. *Amer. J. clin. Nutr.* 21, 327-30 (1968)
- FRIEDMAN, R., D. McKENTIE, T. TURNER & W. WITTMAN: Folic acid deficiency in infantile gastroenteritis. *South Afr. med. J.* 10, 69-73 (1964)
- GAINES, D.S., H.P. BROQUIST & W.L. WILLIAMS: Certain relationships between pteroylglutamic acid, Citrovorum factor and cortisone. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 77, 247-49 (1951)
- GEBHARDT, D.O.E., & J. FABER: The influence of aminopterin on limb regeneration in *Amblystoma mexicanum*. *J. Embryol. exp. Morph.* 16, 143-158 (1966)
- GELFANT, S.: Aminopterin and nitrogen mustard as mitotic inhibitors in mouse ear epidermis in vitro. *Exp. Cell Res.* 15, 451-53 (1958)
- GELFANT, S., R.K. MEYER & H. RIS: Uterine growth following stimulation by estrogen and inhibition by aminopterin and nitrogen mustard. *J. exp. Zool.* 128, 219-57 (1955)
- GHILCHIK, M.W., A.S. MORRIS & D.S. REEVES: Immunosuppressive powers of the antibacterial agent trimethoprim. *Nature* 227, 393-94 (1970)
- GILES, C.: An account of 335 cases of megaloblastic anaemia of pregnancy and the puerperium. *J. clin. Path.* 19, 1-11 (1966)
- GILES, P.F.H., A.G. HARCOURT & M.G. WHITESIDE: The effect of prescribing folic acid during pregnancy of birth-weight and duration of pregnancy. A double-blind trial. *Med. J. Austr.* 1971/2, 17-21

- GIRDWOOD, R.H.: Folic acid, its analogs and antagonists. Adv. clin. Chem. 3, 235-97 (1960)
- Folate depletion in old age. Amer. J. clin. Nutr. 22, 234-37 (1969)
- GIROUD, A., & J. BOISSELOT: Anomalies provoquées chez la foetus in l'absence d'acide folique. Arch. franç. ped. 8, 648-56 (1951)
- GIROUD, A., J. LEFEBRVES & R. DUPUIS: Repercussions sur l'embryon de la carence en acide folique. Internat. Zschr. Vitaminforsch. 24, 420-429 (1952)
- GÖLTNER, E.: Folsäure und Schwangerschaft. Med. Klin. 66, 973-76 (1971)
- GÖLTNER, E., H. STRIEGEL, E. SCHÜSSLER & G. LEIKAM: Geburtsh. u. Frauenhk. 32, 510-13 (1972)
Der Folsäuregehalt des Blutes in Schwangerschaft und Wochenbett.
- GOETSCH, C.: An evaluation of aminopterin as an abortifaciens. Amer. J. Obst. Gyn. 83, 1474-77 (1962)
- GONTZEA, I.: Angeborene Mißbildungen infolge unrichtiger Ernährung. I. Versuche mit Säugetieren und Beobachtungen am Menschen. Nutr. Dieta 11, 69-75 (1969)
- II. Ätiopathogenetische Betrachtungen. Nutr. Dieta 11, 145-56 (1969)
- GOLDSMITH, E.D., S.S. SCHREIBER & R.F. NIGRELLI: Aminopterin and response of frog oviducts to estradiol. II. Histological studies and mitotic counts. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 461-63 (1949)
- GREENBERG, J.: Inhibition of the antimalarial activity of chlorguanidine by pteroylglutamic acid. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 306-08 (1949)
- GUNLACK, G.B., G.E. NEAL & D.C. WILLIAMS: A colorimetric assay system for tetrahydrofolate dehydrogenase. Biochem. Pharmacol. 17, 484-87 (1968)

- HANSEN, H.A.: On the diagnosis of folic acid deficiency. Acta obst. gyn. Scand. 46, suppl. 7, 13-37
- HANSEN, H.A., & G. RYBO: Folic acid dosage in prophylactic treatment during pregnancy. Acta obst. gyn. Scand. 46, suppl. 7, 107-12 (1967)
- HEPNER, G.W.: The absorption of pteroylglutamate (folic acid) in rats. Brit. J. Haem. 16, 241-49 (1969)
- HERBERT, V.: Serum folic acid activity: assay and nature. J. clin. Invest. 39, 996 (1960)
- Experimental nutritional folate deficiency in man. Trans. Ass. Amer. Physicians 125, 307-20 (1962) - zit. n. CHANARIN (1969).
- Minimal daily adult folate requirement. Arch. int. Med. 110, 649-52 (1962)
- Studies of folate deficiency in man. Proc. Royal Soc. Med. 57, 377-84 (1964)
- Biochemical and hematological lesions in folic acid deficiency. Amer. J. clin. Nutr. 20, 562-69 (1967)
- Nutritional requirements for vitamin B₁₂ and folic acid. Amer. J. clin. Nutr. 21, 743-52 (1968)
- Megaloblastic anemia as a problem in world health. Amer. J. clin. Nutr. 21, 1115-20 (1968)
- HERMAN, R.H., & N.S. ROSENSWEIG: The initiation of protein synthesis. Amer. J. clin. Nutr. 22, 806-12 (1969)
- HIBBARD, B.M.: Defective folate metabolism in pathological conditions of pregnancy. Acta obst. gyn. Scand. 46, suppl. 7, 47-59 (1967)
- HIBBARD, B.M., & E.D. HIBBARD: Folate deficiency in pregnancy. Brit. med. J. 1968/4, 452-53
- The prophylaxis of folate deficiency in pregnancy. Acta obst. gyn. Scand. 48, 339-48 (1969)

- HIBBARD, B.M., & E.D. HIBBARD: The treatment of folate deficiency in pregnancy. *Acta obst. gyn. Scand.* 48, 349-56 (1969)
- Neutrophil hypersegmentation and defective folate metabolism in pregnancy. *J. Obst. Gyn. Brit. Cwlth.* 78, 776-80 (1971)
- HIBBARD, E.D.: FIGLU excretion in pregnancy. *Acta obst. gyn. Scand.* 46, suppl. 7, 61-69 (1967)
- HIBBARD, E.D., & R.W. SMITHELLS: Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet* 1965/1, 1254
- HIBBARD, E.M., E.D. HIBBARD & T.N.A. JEFFCOATE: Folic acid and reproduction. *Acta obst. gyn. Scand.* 44, 375-400 (1965)
- HIGGINS, G.M., D.G. HANLON & K.A. WOODS: The influence of prolonged administration of aminopterin upon the urinary excretion of corticosteroids in rats. *Anat. Rec.* 106, 274-75 (1950)
- HLA-PE, U, & AUNG-THAN-BATU: A new colorimetric method for determination of formiminoglutamic acid in urine. *Anal. Biochem.* 20, 432-38 (1967)
- HOFFBRAND, A.V., S. KREMENCHUKY, P.J. BUTTERWORTH & D.L. MOLLIN: Serum lactic dehydrogenase activity and folate deficiency in myeloid sclerosis and other haematological diseases. *Brit. med. J.* 1966/1, 577-81
- HOFFMAN, G.R.: Studies on the reversal of 5-fluorodeoxyuridine-induced mitotic inhibition by thymidine and thymidine analogues. *Canad. J. Gen. Cytol.* 12, 230-40 (1970)
- HOGAN, A.G., B.L. O'DELL & J.R. WHITLEY: Maternal nutrition and hydrocephalus in newborn rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 74, 293-96 (1950)

- HOOGSTRATEN, B., H. BAKER & P. REIZENSTEIN: Correlation between serum folate activity and response to antifolate therapy. *Blood* 17, 787 (1961)
- HURDLE, A.D.F., & T.C. PICTON WILLIAMS: Folic acid deficiency in elderly patients admitted to hospital. *Brit. med. J.* 1966/2, 202-05
- HUTCHINGS, B.L., E.L.R. STOKSTAD, J.H. BOOTHE, J.H. MOWAT, C.W. WALLER, R.B. ANGIER, J. SEMB & Y. SUBBAROW: A chemical method for the determination of pteroylglutamic acid and related compounds. *J. biol. Chem.* 168, 705-10 (1947)
- HUTNER, S.H., H.A. NATHAN & H. BAKER: Metabolism of folic acid and other pterin=pteridine vitamins. *Vitamins & Hormones* 17, 1-52 (1959)
- IYENGAR, L.: Folic acid requirements of Indian pregnant women. *Amer. J. Obst. Gyn.* 111, 13-16 (1971)
- IZAK, G., M. RACHMILEWITZ, L. CHIRASIRI & N. GROSSOWICZ: The effect of acute haemorrhage and haemolysis on folate metabolism in the rat. *Brit. J. Haem.* 12, 92-98 (1966)
- IZAK, G., M. RACHMILEWITZ, N. GROSSOWICZ, K. GALEWSKI & M. JABLONSKA: The distribution of folates in rabbit tissues during phenylhydrazine-induced haemolysis. *Brit. J. Haem.* 16, 323-28 (1969)
- JACOBSON, W.: Cellular injuries caused by folic acid antagonists and some corticosteroids. in: DE REUCK & KNIGHT (eds.): CIBA Found. Sympos. on Cellular Injury, London 1964, 136-66
- JAENICKE, L., & W. WILMANN: Der Stoffwechsel der Folsäure und der Einkohlenstoffeinheiten. *Klin. Wschr.* 41, 1029-38 (1963)
- JANZ, D., & U. FUCHS: Sind antiepileptische Medikamente während der Schwangerschaft schädlich? *Dtsch. med. Wschr.* 89, 241-43 (1964)

- JENKINS, G.C., D.T.D. HUGHES & P.C. HALL: A haematological study of patients receiving long-term treatment with trimethoprim and sulphonamide. *J. clin. Path.* 23, 392-96 (1970)
- JOHNSON, E.M.: Effects of maternal folic acid deficiency on cytologic phenomena in the rat embryo. *Anat. Rec.* 149, 49-56 (1964)
- Nutritional factors in mammalian teratology. In: WILSON & WARKANY (eds.): *Teratology. Principles and Techniques*. Chicago-London 1965, 113-124
- JOHNSON, E.M., & R.J. SCHULTZ: Qualitative and quantitative compartmentalization of isoenzymes in teratogen-treated systems. *Anat. Rec.* 169, 348 (1971)
- JOHNSON, E.M., M.M. NELSON & I.W. MONIE: Effects of transitory pteroylglutamic acid (PGA) deficiency on embryonic and placental development in the rat. *Anat. Rec.* 215-24 (1963)
- JUKES, T.H.: Assay of compounds with folic acid activity. In: GLICK (ed.): *Methods of Biochem. Analysis*, vol. 2, 121-51 (New York 1955)
- JUKES, T.H., & H.P. BROQUIST: Sulfonamides and folic acid antagonists. In: HOCHSTER & QUASTEL (eds.): *Metabolic inhibitors. A comprehensive treatise*. 1, 481-534 (1963)
- KALMAN, T.I.: Mechanism of reaction catalyzed by thymidylate synthetase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 186, 166-67 (1971)
- KALTER, H.: Interplay of intrinsic and extrinsic factors. In: WILSON & WARKANY (eds.): *Teratology. Principles and Techniques*. Chicago-London 1965, 57-80
- KARLIN, R.: Sur la détermination de l'activité folique du sang humain chez des témoins et dans divers états pathologiques. *Internat. Z. Vitaminforsch.* 39, 44-64 (1969)

- KARLIN, R., & R. LEVRAT: Effet de l'association trimethoprime-sulfamethoxazole sur les taux sanguine de folates. *Internat. J. Vitamin & Nutr. Res.* 42, 55-62 (1972)
- KARNOPSKY, D.A.: In: WILSON & WARKANY (eds.): *Teratology. Principles and Techniques*. Chicago - London 1965, 185-94 Mechanisms of action of certain growth-inhibiting drugs.
- KARNOPSKY, D.A., P.A. PATTERSON & L.R. RIDGWAY: Effect of folic acid, "4-amino"-folic acids, and related substances on growth of chick embryos. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 71, 447-52 (1949)
- KASS, L.: A clockface chromatin pattern in the intermediate megaloblast of vitamin B₁₂ or folate deficiency. *Blood* 32, 711-16 (1968)
- KAUNG, D.T., & A.A. SWARTZENDRUBER: Effect of chemotherapeutic agents on chromosomes of patients with lung cancer. *Dis. Chest* 55, 98-100 (1969)
- KHAN, A.U., R.W. MONTO & L.B. STEVENSON: Megaloblastic anemia of pregnancy. *Obst. Gyn.* 31, 1-8 (1968)
- KITAY, D.Z.: Folic acid deficiency in pregnancy. On the recognition, pathogenesis, consequences and therapy of the deficiency state in human reproduction. *Amer. J. Obst. Gyn.* 104, 1067-1107 (1969)
- KITAY, D.Z., & W. BUDDWENTZ: Cervical cytology in folic acid deficiency of pregnancy. *Amer. J. Obst. Gyn.* 104, 931-38 (1969)
- KITAY, D.Z., & J.S. MARSHALL: Remission of folic acid deficiency in pregnancy. *Amer. J. Obst. Gyn.* 102, 297-303 (1968)
- KITAY, D.Z., W.J. HOGAN, B. EBERLE & T. MYNT: Neutrophil hypersegmentation and folic acid deficiency in pregnancy. *Amer. J. Obst. Gyn.* 104, 1163-73 (1969)
- KLAUS, H.: Quantitative criteria of folate deficiency in cervico-vaginal cytograms, with report of a new parameter. *Acta cytol.* 15, 50-53 (1971)

- KLIPSTEIN, F.A.: Subnormal serum folate and macrocytosis associated with anticonvulsant drug therapy. *Blood* 23, 68-86 (1964)
- Intestinal folate conjugase activity in tropical sprue. *Amer. J. clin. Nutr.* 20, 1004-09 (1967)
- Symposium on malabsorption and malnutrition in the Tropics. Foreword. *Amer. J. clin. Nutr.* 21, 939-41 (1968)
- KLIPSTEIN, F.A., & LINDENBAUM, J.: Folate deficiency in chronic liver disease. *Blood* 25, 443-56 (1965)
- KLIPSTEIN, F.A., & S.D. LIPTON: Intestinal flora of folate-deficient mice. *Amer. J. clin. Nutr.* 23, 132-40 (1970)
- KLIPSTEIN, F.A., & I.M. SAMLOFF: Folate synthesis by intestinal bacteria. *Amer. J. clin. Nutr.* 19, 237-46 (1966)
- KLIPSTEIN, F.A., F.G. BERLINGER & L.J. REED: Folate deficiency associated with drug therapy for tuberculosis. *Blood* 29, 697-712 (1967)
- KOIDE, Y., T. AOKI & M.M. HRESHCHYSHYN: Effects of hormones, methotrexate, and dactinomycin on benign trophoblast. *Amer. J. Obst. Gyn.* 109, 453-56 (1971)
- KRUMDIECK, C.L., & C.M. RAUGH: Radioactive assay of folic acid polyglutamate conjugase(s). *Anal. Bioch.* 35, 123-29 (1970)
- LANDON, M.J., & A. OXLEY: Relation between maternal and infant blood folate activities. *Arch. Dis. Childh.* 46, 810-14 (1971)
- LINDHE, B.-Å.: Pregnancy anemia with special reference to folic acid deficiency. *Acta obst. gyn. Scand.* 46, suppl. 7, 117-20 (1967)
- LOMAKINA, L.J., M.V. ZHILINA & L.G. SAGDEEVA: *Teratologiya* 2, 1155-59 (1967) The action of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and aminopterin on the mitotic cycle in the culture of Chinese hamster cells. (russ.- Exc. Med., Sect. I, 22, 265 -1968-)

- LOW-BEER, T.S., C.F. MCCARTHY, A. BRZECHWA-AJDUKIEWICZ & A.E. READ: Serum vitamin B₁₂ levels and vitamin B₁₂ binding capacity in pregnant and non-pregnant Europeans and West-Indians. Brit. med. J. 1968/4, 160-61
- LOWENSTEIN, L., L. BRUNTON & Y.S. HSIEH: Nutritional anemia and megaloblastosis in pregnancy. Canad. med. Ass. J. 94, 636-45 (1966)
- LUHBY, A.L., et al.: Can the pill lead to folic acid deficiency ? Med. World News, May 14, 1971
- LUHBY, A.L., J.M. COOPERMAN & D.N. TELLER: Histidin metabolic loading test to distinguish folic acid deficiency from vitamin B₁₂ in megaloblastic anemias. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 101, 350-52 (1959)
- MALDONADO, N., J. FRADERA, R. SANTINI, E. HORTA & E. PEREZ-SANTIAGO: Hematologic response to physiologic doses of folic acid in tropical sprue. Amer. J. clin. Nutr. 22, 733-39 (1969)
- MALEY, F., & G.F. MALEY: Nucleotide interconversions. II. Elevation of deoxycytidylate deaminase and thymidylate synthetase in regenerating rat liver. J. biol. Chem. 235, 2968-70 (1960)
- MARGOLIS, S., F.S. PHILIPS & S.S. STERNBERG: The cytotoxicity of methotrexate in mouse small intestine in relation to inhibition of folic acid reductase and of DNA synthesis. Cancer Res. 31, 2037-46 (1971)
- MARKKANEN, T.: Absorption tests with natural folate in controls and in gastrectomized patients. Amer. J. clin. Nutr. 21, 473-81 (1968)
- MARKKANEN, T., & O. PETTOLA: Binding of folic acid activity by body fluids. Acta haem. 43, 272-79 (1970)
- Carrier proteins of folic acid activity in human serum. Acta haem. 45, 106-11 (1971)

- MARKKANEN, T., A. LEVANTO & O. CASTRÉN: Folate metabolism in connection with parturition. *Internat. Zschr. Vitaminforsch.* 39, 37-43 (1969)
- MARTIN, R.H., T.A. HARPER & W. KELSO: Serum folic acid in recurrent abortions. *Lancet* 1965/1, 670-72
- MARVIN, H.N., B. KELLEY & J.H. TOTTER: The effect of high-glycine diets, with or without pteroylglutamic acid (PGA) and vitamin B₁₂, on growth and endocrine organs of rats. *Anat. Rec.* 106, 220 (1950)
- McELWEE, P.G., & J.M. SCOTT: Folate metabolism in *S. faecalis*. *Biochem. J.* 127, 901-06 (1972)
- McLEAN, F.W., M.W. HEINE, B. HELD & R.R. STREIFF: Relationship between the oral contraceptive and folic acid metabolism. *Amer. J. Obst. Gyn.* 104, 745-47 (1969)
- Folic acid absorption in pregnancy: Comparison of the pteroylglutamate and pteroylpolyglutamate. *Blood* 36, 628-31 (1970)
- MELTZER, H.J.: Congenital anomalies due to attempted abortion with 4-aminopteroyl-glutamic acid. *J. Amer. med. Ass.* 161, 1253 (1956)
- MERKER, H.-J., & H. VILLEGAS: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem des Stoffaustausches zwischen Mutter und Keim bei Rattenembryonen des Tages 7 - 10. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* 131, 325-46 (1970)
- MESCHAN, I., & J. CASTELLS: The utilization of methotrexate, aminopterin, spleen homogenate, thymus homogenate, and DNA as test agents for suppression of DNA synthesis in regenerating rat liver. *Radiology* 83, 520-27 (1964)
- METZ, J.: Folate deficiency conditioned by lactation. *Amer. J. clin. Nutr.* 23, 843-47 (1970)
- METZ, J., R. ZALUSKY & V. HERBERT: Folic acid binding by serum and milk. *Amer. J. clin. Nutr.* 21, 289-97, 447 (1968)
- MILLBANK, L., R.E. DAVIS, M. RAWLINS & A.H. WATERS: Automation of the assay of folate in serum and whole blood. *J. clin. Path.* 23, 54-59 (1970)

- MILLINGTON, P.F., J.B. FINEAN, O.C. FORBES & A.C. FRASER:
Studies of the effects of aminopterin on
the small intestine of rats. I. The morpho-
logical changes following a single dose of
aminopterin. *Exp. Cell Res.* 28, 162-78
(1962)
- MILUNSKY, A., J.W. GRAEF & M.F. GAYNOR jr.: Methotrexate-
induced congenital malformations (with a
review of the literature). *J. Pediat.*
72, 790-95 (1968)
- MONIE, I.W.: Abnormalities of the pulmonary blood ves-
sels in rat fetuses resulting from transi-
tory pteroylglutamic acid deficiency.
Anat. Rec. 127, 337 (1957)
- MONIE, I.W., M.M. NELSON & H.M. EVANS: Abnormalities of
the urinary system of rat embryos resulting
from maternal pteroylglutamic acid defi-
ciency. *Anat. Rec.* 120, 119-36 (1954)
- MONIE, I.W., C.D. BAIRD, M.M. NELSON & H.M. EVANS: Car-
diovascular malformations in rat fetuses
from mothers suffering transitory pteroyl-
glutamic acid deficiency during pregnancy.
Anat. Rec. 121, 409 (1955)
- MONIE, I.W., V. KARVOCHOS & M.M. NELSON: Abnormal pulmo-
nary veins in rat fetuses as a result of
transitory maternal pteroylglutamic acid
deficiency. *Anat. Rec.* 124, 424 (1956)
- MONIE, I.W., M.M. NELSON & H.M. EVANS: Abnormalities of
the urinary system of rat embryos resulting
from transitory deficiency of pteroylgluta-
mic acid during gestation. *Anat. Rec.* 127,
711-24 (1957)
- MULGAONKAR, A.G., & A. SREENIVASAN: Alterations in rat
serum proteins in single deficiencies of
folic acid and vit. B₁₂. *Proc. Soc. exp.*
Biol. Med. 98, 652-55 (1958)
- NABER, E.C., E.C. SNELL & W.W. CRAVENS: Effect of nucleic
acid derivatives in the reversal of amino-
pterin inhibition in the chick embryo.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 20-23 (1952)

- NELSON, M.M.: Production of congenital anomalies in mammals by maternal dietary deficiencies. *Pediatrics* 19, suppl., 764-76 (1957)
- NELSON, M.M., C.W. ASLING & H.M. EVANS: Congenital abnormalities in foetal rats resulting from pteroylglutamic ("folic") acid deficiency during gestation. *Anat. Rec.* 106, 309 (1950)
- Production of multiple congenital abnormalities in young by maternal pteroylglutamic acid deficiency during gestation. *J. Nutr.* 48, 61-80 (1952)
- NELSON, M.M., H.V. WRIGHT, C.W. ASLING & H.M. EVANS: Multiple congenital abnormalities resulting from transitory deficiency of pteroylglutamic acid during gestation in the rat. *J. Nutr.* 56, 349-70 (1955)
- NELSON, M.M., WRIGHT, H.V., C.D.C. BAIRD & H.M. EVANS: Effects of 36-hour period of pteroylglutamic acid deficiency on fetal development in the rat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 92, 554-56 (1956)
- NETZLOFF, M.L.: Respiration by normal rat embryos compared to those subjected to the teratogen 9-methyl-PGA. *Anat. Rec.* 157, 293 (1967)
- NETZLOFF, M.L. & S. KAPLAN: Effects of a teratogen on the Q_{O_2} of dispersed embryonic cells. *Anat. Rec.* 163, 235 (1969)
- NEUBERT, D.: Beeinflussung des Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsels durch Pharmaka. *Internist* 7, 435-54 (1966)
- NGU, V.A., D. ROBERTS & T.C. HALL: Studies on folic reductase. I. Levels in regenerating rat liver and the effect of methotrexate administration. *Cancer Res.* 24, 989-93 (1964)
- NICHOL, C.A.: Summary of informal discussions on the role of folic acid antagonists. *Cancer Res.* 23, 1307-10 (1963)

- NICHOL, C.A., & A.D. WELCH: On the mechanism of action of aminopterin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 74, 403-11 (1950)
- NIEKERK, W.A. van: Cervical cytological abnormalities caused by folic acid deficiency. *Acta cytol.* 10, 67-73 (1966)
- NORONHA, J.M., & M. SILVERMAN: Distribution of folic acid derivatives in natural material. I. Chicken liver folates. *J. biol. Chem.* 237, 3299-3302 (1962)
- NOTO, T.: The effect of some vitamins on the morphogenesis and differentiation in the early chick embryo. *Science Rep. Tohoku Univ.* 33, 249-54 (1967)
- NYSTRÖM, B., & C. NYSTRÖM: On the biochemistry of folic acid. *Acta obst. gyn. Scand.* 46, suppl. 7, 89-101 (1967)
- NYSTRÖM, C.: Biochemical effects of thalidomide. A preliminary report. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 15, 102-03 (1963)
- O'DELL, D.S., & J. MCKENZIE: The action of aminopterin on the explanted chick embryo. *J. Embryol. exp. Morph.* 11, 185-200 (1963)
- OKAMOTO, K.: A histopathological study on changes in the digestive organs in experimental folic acid deficiency, using rats. *Vitamins (Tokyo)* 28, 59-64 (1963) (jap. - *Exc. Med. Sect. I.*, 18, 680-1964-)
- OLESON, J.J., & P.A. LITTLE: Effect of pteroylglutamic acid and vitamin B₁₂ on growth of Rous tumor implants. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 71, 226-27 (1949)
- ONICESCU, D., L. TAȘCO & E. TRUTZA: A histochemical method for dihydrofolate reductase. *Histochem. J.* 2, 289-95 (1970)

- OVERHOLSER, M.D., J.R. WHITLEY, B.L. O'DELL & A.G. HOGAN:
A study of hydrocephalic brains of rats
from dams on a vitamin deficient diet.
Anat. Rec. 106, 228-29 (1950)
- The ventricular system in hydrocephalic
rat brains produced by a deficiency of vi-
tamin B₁₂ or of folic acid in the mater-
nal diet. *Anat. Rec.* 120, 917-33 (1954)
- PAGET, G.E., & E. THORPE: A teratogenic effect of a sul-
phonamide in experimental animals. *Brit.*
J. Pharmacol. 23, 305-12 (1964)
- PALVA, I.P., & S.J. SALOKANNEL: Seasonal variation in me-
galoblastic anaemia. *Brit. J. Nutr.* 27,
593-95 (1972)
- PASTORE, E.J., & M. FRIEDKIN: The enzymatic synthesis of
thymidylate. II. Transfer of tritium from
tetrahydrofolate to the methyl group of
thymidylate. *J. biol. Chem.* 237, 3802-10
(1962)
- PATON, A. Oral contraceptives and folate deficiency.
Lancet 1969/1, 418
- PAUL, J., H. THOROU, G. THRELFALL & D.M. KOHL: The effect
of folic acid on nuclear RNA synthesis in
mouse kidneys. *J. Cell Biol.* 43, 102a (1969)
- PEER, L.A., W.H. BRYAN, L.P. STREAN, J.C. WALKER jr., W.
G. BERNHARD & G.C. PECK: Induction of
cleft palate in mice by cortisone and its
reduction by vitamins. *J. int. Coll. Sur-
geons.* 30, 249-54 (1958)
- PERRY, J., & I. CHANARIN: Absorption and utilization of
polyglutamyl forms of folate in man.
Brit. med. J. 1968/4, 546-49
- POCHKOV, V.F.: Teratogenic action of aminopterin and 5-
fluorouracil on 4 - 23 somite chick em-
bryos after application in ovo. *Byull.*
eksper. Biol. Med. 64:7, 99-102 (1967)
(russ. - Exc. Med. Sect. I, 22, 158 -1968-)

- PRENSKY, W., & W.L. HUGHES: Utilization of the quantimet for studying the effect of amethopterin on cell proliferation in vivo. *J. Cell Biol.* 47, 161a (1970)
- PRITCHARD, J.A., P.J. WHALLEY & D.E. SCOTT: The influence of maternal folate and iron deficiencies on intrauterine life. *Amer. J. Obst. Gyn.* 104, 388-96 (1969)
- PRITCHARD, J.A., D.E. SCOTT & P.J. WHALLEY: Maternal folate deficiency and pregnancy wastage. IV. Effects of folic acid supplements, anti-convulsants, and oral contraceptives. *Amer. J. Obst. Gyn.* 109, 341-46 (1971)
- RAE, P.G., & P.M. ROBB: Megaloblastic anaemia of pregnancy: a clinical and laboratory study with particular reference to the total and labile serum folate levels. *J. clin. Path.* 23, 379-91 (1970)
- RAURAMO, L., O. CASTREN, A. LEVANTO, T. MARKKANEN, A. KIUOSKI & S. RUPONE: Serum folic acid content in pregnancy. *Acta obst. gyn. Scand.* 46, suppl. 7, 101-05 (1967)
- REGISTER, U.D., & H.P. SARETT: Urinary excretion of vitamin B₁₂, folic acid, and Citrovorum factor in human subjects on various diets. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 77, 837-39 (1953)
- REIZENSTEIN, P.G.: Cytochemical changes in bone marrow cells from rats treated with aminopterin. A microspectrophotometric study of individual cells. *Acta haem.* 23, 65-73 (1960)
- Errors and artefacts in serum folic acid assay. Effects of age, food, drugs, and radiation. *Acta med. Scand.* 178, 133-39 (1965)
- RETIEF, F.P., & Y.J. HUSKINSON: Serum and urinary folate in liver disease. *Brit. med. J.* 1969/2, 150-153
- RICCIARDI, F.T., & A.S. GORDON: Influence of growth hormone on the hemopoietic depression action of aminopterin. *Anat. Rec.* 128, 605 (1957)

- RICHARDSON, L.R.: Nutritional hydrocephalus in infant rats. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 76, 142-144 (1951)
- ROBERTS, D., T.C. HALL: Studies on folic reductase. II. Enzyme activity of embryonic organs of the chicken, rat, and human. Cancer Res. 25, 1894-98 (1965)
- ROBERTS, P.D., A.V. HOFFBRAND & D.L. MOLLIN: Iron and folate metabolism in tuberculosis. Brit. med. J. 1966/2, 198-202
- ROETZ, R., & K.-P. HAMPEL: Veränderungen des Folatspiegels und der Eisensättigung des Serums bei Schwangeren. Teilergebnisse einer Längsschnittuntersuchung. Geburtsh. & Frauenhk. 1972 (im Druck)
- ROETZ, R., & H.-J. MERKER: Die Bedeutung der Folsäure für Schwangerschaft und Entwicklung des Menschen. Therapiewoche 22, 255-69 (1972)
- ROETZ, R., & J. NEVINNY-STICKEL: Serumfolat und Serumeisen unter kontrazeptiver Medikation. 1973 (in Vorbereitung)
- ROETZ, R., E. FIGLOSIWICZ & E. KÖHLER: Morphological studies on decidua and embryonic rat-tissues after application of methotrexate. Europ. Teratol. Soc., 2nd Conf., May 21-25, 1972, Prague, CSSR
- ROTHENBERG, S.P.: A radioassay for serum folate: Use of a two-phase sequential incubation, ligand-binding system. New Engl. J. Med. 286, 1335-39 (1972)
- ROTHENBERG, S.P., & F. GIZIS: Quantitative aspects of the binding of folic acid by folate antiserum. Cancer Res. 31, 1095-99 (1971)
- ROTHMAN, D.: Folic acid in pregnancy. Amer. J. Obst. Gyn. 108, 149-75 (1970)
- ROVINETTI, C., C. BOVINA, B. TOLOMELLI & M. MARCHETTI: Effects of testosterone on the metabolism of folate coenzymes in the rat. Biochem. J. 126, 291-94 (1972)

- RUECKERT, R.R., & G.C. MUELLER: Studies on unbalanced growth in tissue culture. I. Induction and consequences of thymidine deficiency. *Cancer Res.* 20, 1584-91 (1960)
- RUNNER, M.N.: Inheritance of susceptibility to congenital deformity. Clues provided by experiments with teratogenic agents. *Pediatrics* 23, 245-51 (1959)
- General mechanisms in teratogenesis. In: WILSON & WARKANY (eds.): *Teratology. Principles and Techniques*. Chicago-London 1965 95-103
- RUSTIA, M., & P. SHUBIK: Puerperal acute toxicity indirectly induced by 4-amino-N¹⁰-pteroyl-glutamic acid (methotrexate) in mice. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 137, 495-97 (1971)
- RYSER, J.F., J.J. FARQUET & J. PETITE: Megaloblastic anaemia due to folic acid deficiency in a young woman on oral contraceptives. *Acta haem.* 45, 319-24 (1971)
- SANTINI, R., E. PEREZ-SANTIAGO, L. WALKER & C.E. BUTTERWORTH jr.: Folic acid conjugase in normal human plasma and in the plasma of patients with tropical sprue. *Amer. J. clin. Nutr.* 19, 342-44 (1966)
- SCHMIDT, I.G., & L.H. SCHMIDT: The hemotoxicity of pyrimethamine and its prevention of folic and folinic acid. *Anat. Rec.* 124, 439 (1956)
- SCHOEN, G.: Analisi cromatografica su carta delle vitamine. *Acta vitaminol.* 7, 151-67 (1953)
- SCOTT, D.E., P.J. WHALLEY & J.A. PRITCHARD: Maternal folate deficiency and pregnancy wastage. II. Fetal malformation. *Obst. Gyn.* 36, 26-28 (1970)
- SHAW, E.B., & H.L. STEINBUCH: Aminopterin-induced fetal malformation. *Amer. J. Dis. Child.* 115, 477-82 (1968)

- SHEEHY, T.W., M.E. RUBINI, E. PEREZ-SANTIAGO, R. SANTINI jr. & J. HADDOCK: The effect of "minute" and "titrated" amounts of folic acid on the megaloblastic anemia of tropical sprue. *Blood* 18, 623-36 (1961)
- SHIOTA, T.: The biosynthesis of folic acid and 6-substituted pteridine derivatives. *Compreh. Bioch.* 21, 111-152 (1971)
- SHIVE, W.: Folic acid and pteridines. *Compreh. Bioch.* 11, 82-102 (1963)
- SHOJANIA, A.M., G. HORNADY & P.H. BARNES: Oral contraceptives and serum-folate levels. *Lancet* 1968/1, 1376-77
- The effect of oral contraceptives on folate metabolism. *Amer. J. Obst. Gyn.* 111, 782-91 (1971)
- SIDDIQUI, J., R. FREEBURGER & R.M. FREEMAN: Folic acid, hypersegmented polymorphonuclear leukocytes and the uremic syndrome. *Amer. J. clin. Nutr.* 23, 11-16 (1970)
- SILBER, R., & A. MANSOURI: Regulation of folate-dependent enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 186, 55-69 (1971)
- SILBER, R., F.M. HUENNEKENS & B.W. GABRIO: Pattern of dihydrofolic reductase and tetrahydrofolate-dependent enzymes in the developing chick embryo. *Arch. Biochem. Biophys.* 99, 328-33 (1962)
- SILBER, R., B.W. GABRIO, F.M. HUENNEKENS & A. ALENTY: Studies on normal and leukemic leukocytes. VI. Thymidylate synthetase and deoxycytidylate deaminase. *J. clin. Invest.* 42, 1913-21 (1963)
- SIVA SANKAR, D.V., A. GEISLER & P.W. ROZSA: Intercellular distribution of folic acid in mouse liver. *Experientia* 25, 691-92 (1969)
- SJÖVALL, A., S. KULLANDER & B. BJERRE (eds.): Proceedings of an Symposium on Folic Acid and Pregnancy. Held on March 19, 1966 in Falsterbo, Sweden. *Acta obst. gyn. Scand.* 46, suppl. 7, (1967)

- SLAVIK, K., & V. SLAVIKOVA: The application of folic acid analogues in enzyme investigations. Acta Univ. Carolin. Med. Monogr. No. 37, pp. 161 (1969)
- SMITH, C.G., J.E. GRADY & J.I. NORTHAM: Relationship between cytotoxicity in vitro and whole animal toxicity. Cancer Chemother. Rep. no. 30, 9-12 (1963)
- SNELL, E.E., & W.W. CRAVENS: Reversal of aminopterin inhibition in the chick embryo with deoxyribosides. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74, 87-91 (1950)
- SOKAL, J.E., & E.M. LESSMANN: Effects of cancer chemotherapeutic agents on the human fetus. J. Amer. med. Ass. 173, 1765-71 (1960)
- SPECTOR, I., & J. METZ: Folate and vitamin B₁₂ metabolism in weanling rats given a maize diet. I. Folate and vitamin B₁₂ concentrations in liver and serum. Amer. J. clin. Nutr. 19, 187-93 (1966)
- Giant myeloid cells in the bone marrow of protein malnourished infants: Relationship to folate and vitamin B₁₂ nutrition. Brit. J. Haem. 12, 737-46 (1966)
- SPRAY, G.H.: Microbiological assay of folic acid activity in human serum. J. clin. Path. 17, 660-65 (1964)
- Oral contraceptives and serum folate levels. Lancet 1968/2, 110-111
- STEFFEN, J.A., & W.M. STOLZMANN: Studies on in vitro lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis. I. Variability of S plus G₂ periods of first generation cells. Exp. Cell Res. 56, 453-60 (1969)
- STEPHENS, M.E.M., & I. CRAFT, T.J. PETERS, A.V. HOFFBRAND: Oral contraceptives and folate metabolism. Clin. Sci. 42, 405-14 (1972)

- STEMPAK, J.G.: Etiology of antenatal hydrocephalus induced by folic acid deficiency in the albino rat. *Anat. Rec.* 151, 287-96 (1965)
- STONE, M.L., A.L. LUHBY, R. FELDMAN, M. GORDON & J.M. COOPERMAN: Folic acid metabolism in pregnancy. *Amer. J. Obst. Gyn.* 99, 638-48 (1967)
- STREIFF, R.R.: Folate deficiency and oral contraceptives. *J. Amer. med. Ass.* 204, 105-08 (1970)
- STUART, J., & P.N. SKOWRON: A cytochemical study of marrow enzymes in megaloblastic anaemias. *Brit. J. Haem.* 15, 443-54 (1968)
- TABOR, H., & L. WYNGARDEN: The enzymatic formation of forminotetrahydrofolic acid, 5,10-methylnyltetrahydrofolic acid, and 10-formyltetrahydrofolic acid in the formation of formiminoglutamic acid. *J. biol. Chem.* 234, 1830-46 (1959)
- TAYLOR, A., & N. CARMICHAEL: Male mice tolerate dosages of pteroylglutamic acid lethal to females. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 71, 544-45 (1949)
- TEPLY, L.J., & C.A. ELVEHJEM: The titrimetric determination of Lactobacillus casei factor and folic acid. *J. biol. Chem.* 157, 303-09 (1945)
- TERENTEVA, E.I., & F.E. FEINSHTEIN: Patol. Fiziol. i eksper. Terap. 1958:3/4, 43-46 Experimental investigation of the action of certain therapeutic preparations on haemopoietic cells in tissue cultures. (russ. - Exc. Med. Sect. I, 15, 57 -1961-)
- THIERSCH, J.B.: The control of reproduction in rats with the aid of antimetabolites and early experiments with antimetabolites as abortifacient agents in man. *Acta endocrin. (Kbh.) suppl.* 28, 37-45 (1956)
- Therapeutic abortions with a folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (4-amino P.G.A.) administered by the oral route. *Amer. J. Obst. Gyn.* 63, 1298-1304 (1952)

- THIERSCH, J.B., & F.S. PHILIPS: Effects of 4-amino-pteroylglutamic acid in dogs with special reference to megaloblastosis. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 484-80 (1949)
- Effects of 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin) on early pregnancy. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 74, 204-08 (1950)
- THRELFALL, G., D.M. TAYLOR & T.R. BUCK: The effect of folic acid on growth and deoxyribonucleic acid synthesis in the rat kidney. Labor. Invest. 15, 1477-85 (1966)
- TOENNIS, G., H.G. FRANK & D.L. GALLANT: On the folic acid activity of human blood. J. biol. Chem. 200, 23-30 (1952)
- TOENNIS, G., E. USDIN & P.M. PHILLIPS: Precursors of the folic acid-active factors of blood. J. biol. Chem. 221, 855-63 (1956)
- TOLOMBELLI, B., C. ROVINETTI, C. BOVINA & M. MARCHETTI: Studies on folate metabolism in castrated rats and those treated with testosterone. Experientia 28, 197-98 (1972)
- TOYHILL, P.J., & P.G. SMITH: Folate deficiency and the pill. Brit. med. J. 1971/1,608
- TUCHMANN-DUPLESSIS, H.; The action of anti-tumour drugs on gestation and on embryogenesis. In: BERTELLI & DONATI (eds.): Teratology. Amsterdam 1969, 75-86
- TUCHMANN-DUPLESSIS, H., & J. LEFEBVRES-BOISSILOT: Les effets teratogenes de l'acide x-methylfolique chez la chatte. C.R. Soc. biol. (Paris) 111, 2005-08 (1957)
- TUCHMANN-DUPLESSIS, H., & L. MERCIER-PAROT: Sur l'action teratogene de l'acide x-methylfolique chez la souris. C.R. Acad. Sci. (Paris) 245, 1693-95 (1957)

- USDIN, E.: Blood folic acid studies. VI. Chromatographic resolution of folic acid-active substances obtained from blood. *J. biol. Chem.* 234, 2373-76 (1959)
- USDIN, E., P.M. PHILLIPS & G. TOENNIES: Multiplicity of the folic acid-active factors of blood. *J. biol. Chem.* 221, 865-72 (1956)
- VELEZ, H., A. RESTREPO, J.J. WHITE & E.E. HELLERSTEIN: Folic acid deficiency secondary to iron deficiency. *Amer. J. clin. Nutr.* 19, 27-36 (1966)
- VELARDO, J.T., & F.L. HISAW: Inhibition of the HOOKER-FORBES response by aminopterin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 81, 652-54 (1952)
- VILLADSEN, I.S., & E. ZEUTHEN: Synchronization of DNA synthesis in Tetrahymena populations by temporary limitation of access to thymine compounds. *Exp. Cell Res.* 61, 302-10 (1970)
- WAHBA, A.J., & M. FRIEDKIN: The enzymatic synthesis of thymidylate. I. Early steps in the purification of thymidylate synthetase of Escherichia coli. *J. biol. Chem.* 237, 3794-3801 (1962)
- WARKANY, J., P.H. BEAUDRY & S. HORNSTEIN: Attempted abortion with aminopterin (4-aminopteroylglutamic acid): Malformations of the child. *Amer. J. Dis. Childh.* 97, 274-81 (1959)
- WAXMAN, S., C. SCHREIBER & V. HERBERT: Measurement of serum folate levels by radioisotope dilution assay. *Blood* 36, 858 (1970)
- Radioisotope assay for measurement of serum folate levels. *Blood* 38, 219-27 (1971)
- WEINTRAUB, S., S.D. KRAUS & L.T. WRIGHT: Influence of sex hormones on tolerance to aminopterin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 74, 609-12 (1950)
- WELCH, A.D., & C.A. NICHOL: Water-soluble vitamins concerned with one- and two-carbon intermediates. *Ann. Rev. Biochem.* 21, 633-86 (1952)

- WERKHEISER, W.C.: The biochemical, cellular, and pharmacological action and effects of the folic acid antagonists. *Cancer Res*, 23, 1277-85 (1963)
- Limitations on the therapeutic effectiveness of the folic acid antagonists. *Cancer Res*. 25, 1008-13 (1965)
- WERTHEMANN, A.: Allgemeine und spezielle Probleme bei der Analyse von Mißbildungsursachen, in Sonderheit bei Thalidomid- und Aminopterinschäden. *Schweiz. med. Wschr.* 93, 223-27 (1963)
- WESTERGAARD, O., & R.F. PEARLMAN: DNA polymerase activity in methotrexate plus uridine treated Tetrahymena. *Exp. Cell Res.* 54, 309-13 (1969)
- WHALLEY, P.J., D.E. SCOTT & J.A. PRITCHARD: Maternal folate deficiency and pregnancy wastage. I. placental abruption. *Amer. J. Obst. Gyn.* 105, 670-78 (1969)
- Maternal folate deficiency and pregnancy wastage. III. Pregnancy-induced hypertension. *Obst. Gyn.* 36, 29-31 (1970)
- WHITLEY, J.R., B.L. O'DELL & A.G. HOGAN: Effect of diet on maze learning in second-generation rats. Folic acid deficiency. *J. Nutr.* 45, 153-60 (1951)
- WILLIAMS jr., J.N.: Interrelationships of folic acid and ascorbic acid in rat liver. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 77, 315-17 (1951)
- WILLIAMS jr., J.N., A. SREENIVASAN, SUNG, SH.-CH., & C.A. ELVEHJEM: Relationship of the deposition of folic and folinic acids to choline oxidase of isolated mitochondria. *J. biol. Chem.* 202, 233-40 (1953)
- WILLIAMS, R.J.: The significance of the vitamin content of tissues. *Vitamins & Hormones* 1, 229-47 (1943)
- WILLOUGHBY, M.L.N.: An investigation of folic acid requirements in pregnancy. II. *Brit. J. Haem.* 13, 503-09 (1967)

- WILLOUGHBY, M.L.N., & F.J. JEWELL: Investigation of folic acid requirements in pregnancy. Brit. med. J. 1966/2, 1568-71
- Folate status throughout pregnancy and in postpartum period. Brit. med. J. 1968/4, 356-60
- WILMANN, W.: Die tetrahydrofolsäure-abhängige Aktivierung von Einkohlenstoffeinheiten in normalen und pathologischen weißen Blutzellen. Klin. Wschr. 39, 884-88 (1961)
- Die Bedeutung von Folsäure und Vitamin B₁₂ für den Zellstoffwechsel. Dtsch. med. Wschr. 89, 2093-98 (1964)
- Thymidylat-Synthese in Leukämiezellen unter der Einwirkung von Folsäure-Antagonisten. 17. Coll. Ges. Physiol. Chem. Mosbach/Baden. "Molekulare Biologie des malignen Wachstums", Berlin 1966, 177-78
- WILMANN, W., & T. BURGMANN: Die Bestimmung der Formiminoglutaminsäureausscheidung als Funktions-test bei Folsäure- und Vitamin B₁₂-Stoffwechselstörungen. Dtsch. med. Wschr. 93, 1801-06 (1968)
- WILSON, J.G.: Use of Rhesus monkeys in teratological studies. Fed. Proc. 30, 104-09 (1971)
- WILSON, S.J., L. COXSEY & C. BOSSI: Development of macrocyclic erythrocytes in leukemic subjects receiving folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 11-13 (1949)
- WOOD, R.C., & G.H. HITCHINGS: Effect of pyrimethamine on folic acid metabolism in Streptococcus faecalis and Escherichia coli. J. biol. Chem. 234, 2377-80 (1959)
- A study of the uptake and degradation of folic acid, Citrovorum factor, aminopterin, and pyrimethamine by bacteria. J. biol. Chem. 234, 2381-85 (1959)

- WOODRUFF, C.W., J.C. PETERSON & W.J. DARBY: Citrovorum factor and folic acid in treatment of megaloblastic anemia in infancy. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 77, 16-18 (1951)
- WOOLLEY, D.W.: Antimetabolites of the water-soluble vitamins. E. Folic acid metabolites. In: Metabolic Inhibitors, ed. by HOCHSTER & QUASTEL, vol. 1, 461-65 (1963)
- ZAKRZEWSKI, S.F., & C.A. NICHOL: The separation and identification of pteroylglutamic acid and related compounds. J. biol. Chem. 205, 361-68 (1953)
- ZITTOUN, J., & R. ZITTOUN: Folate metabolism. Rec. Europ. Etud. clin. biol. 17, 139-46 (1972)

A n h a n g

Abbildung 11

Rattenembryo, Tag 12 (nach 1,2 mg Methotrexat/kg KG
am Tag 10)

Vergr. 1 : 5000

Im neuralen Ektoderm umschriebene Nekrosezone (x),
geschwollene Mitochondrien (M) sowie im Cytoplasma
freie Ribosomen (○).

Abbildung 12

Rattenembryo, Tag 12 (nach 1,2 mg Methotrexat/kg KG
am Tag 10)

Vergr. 1 : 10000

Wie Abbildung 11. Zellkerne (N) mit normaler Struktur.

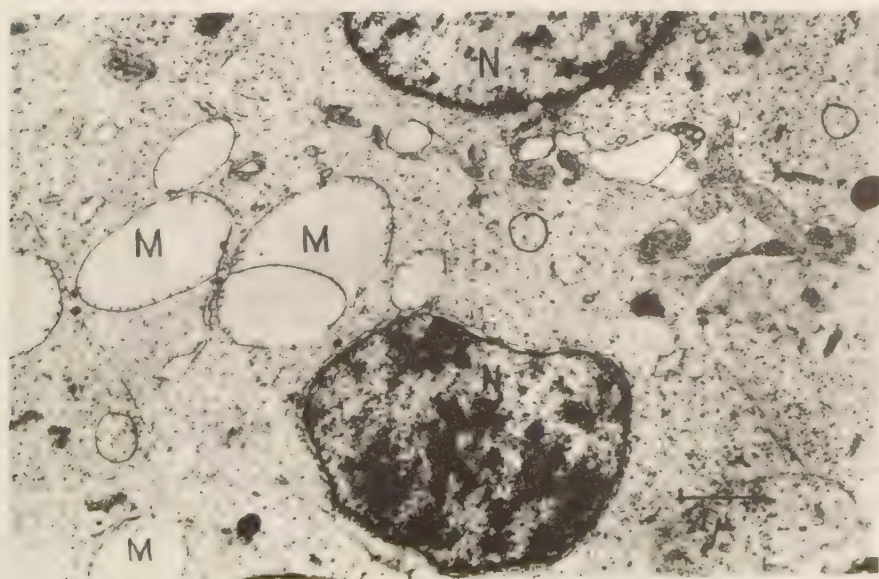
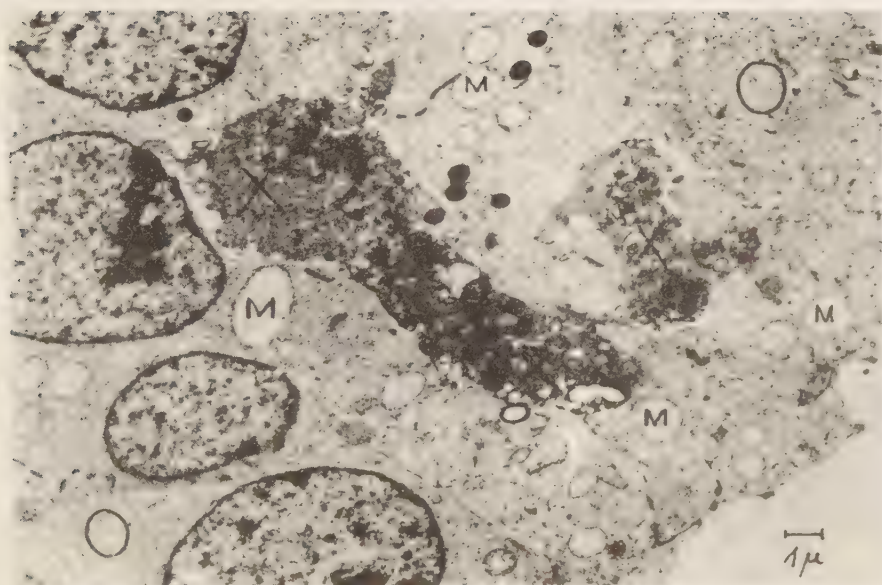


Abbildung 13

Rattendecidua, Tag 12 (unbehandelt)

Vergr. 1 : 6000

Normale Struktur des Zellkerns (N) mit typischem Nukleolus (←). Im Cytoplasma zahlreiche Hohlräume (x) des rauhen endoplasmatischen Retikulums.

Abbildung 14

Rattendecidua, Tag 12 (nach 1,2 mg Methotrexat/kg KG am Tag 10)

Vergr. 1 : 20000

Deutliche Segregation der Kernbestandteile mit Trennung des Rest-Nukleolus (←) von den DNS-Plaques (←t).

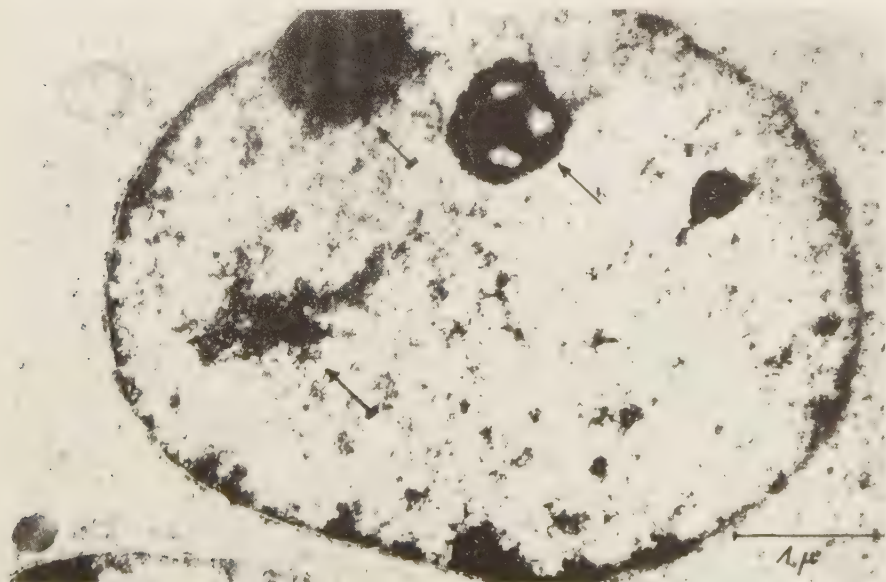
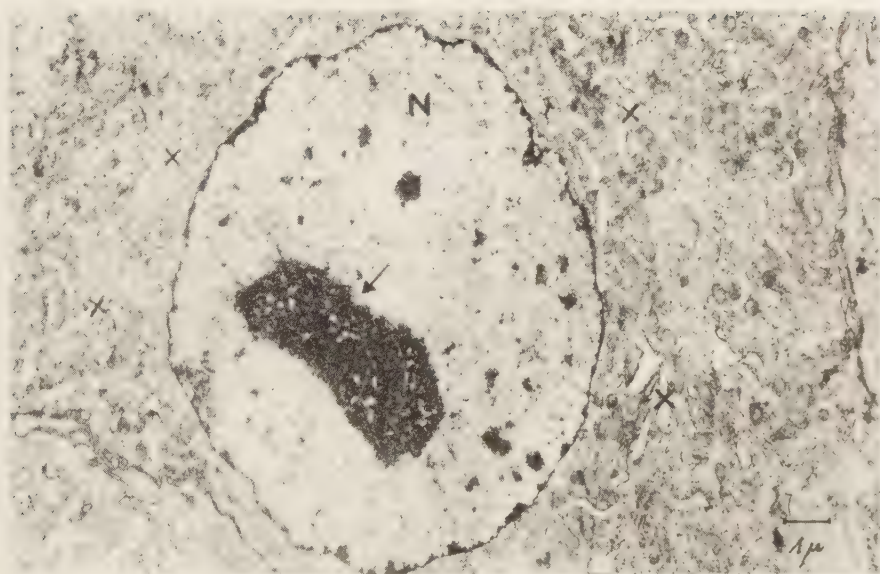


Abbildung 15

Rattendecidua, Tag 12 (nach 1,2 mg Methotrexat/kg KG
am Tag 10)

Vergr. 1 : 15000

Stark verdichtete DNS-Plaques ($\longleftrightarrow$) im Zellkern.

No = Restnukleolus.

Abbildung 16

Rattendecidua, Tag 12 (nach 1,2 mg Methotrexat/kg KG
am Tag 10)

Vergr. 1 : 15000

Deutliche Segregation der Nukleoli ($\longleftrightarrow$), Verdichtung
der DNS-Strukturen ($\longleftrightarrow$) und Auftreten von Perichroma-
tin-Granula ($\longleftrightarrow$). Fragmentierung (x) der Hohlräume
des endoplasmatischen Retikulums im Cytoplasma.

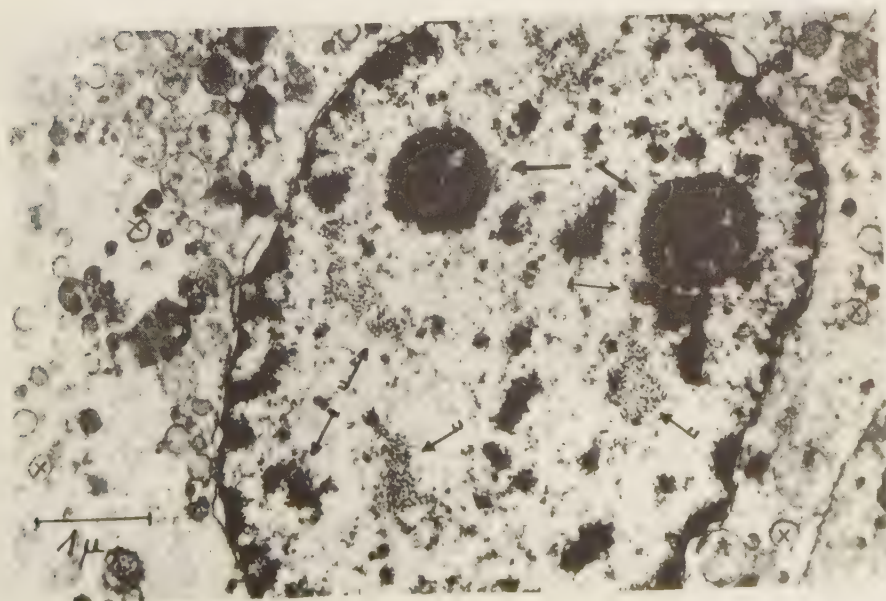
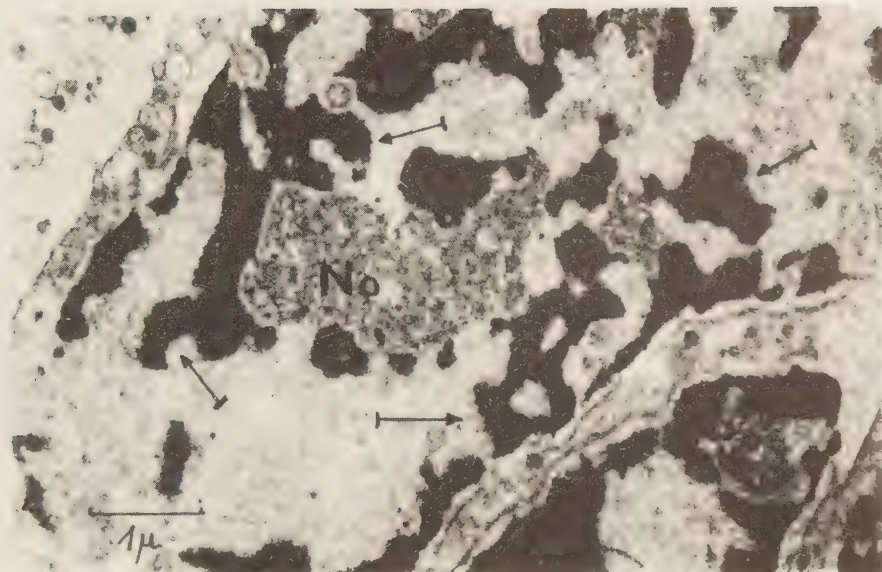


Abbildung 17

Rattendecidua Tag 12 (nach 1,2 mg Methotrexat/kg KG
am Tag 10)

Vergr. 1 : 10000

Zelle in Mitose. Reste der Kernmembran (←) dem Chro-
matin anhaftend.

Abbildung 18

wie Abb. 17.

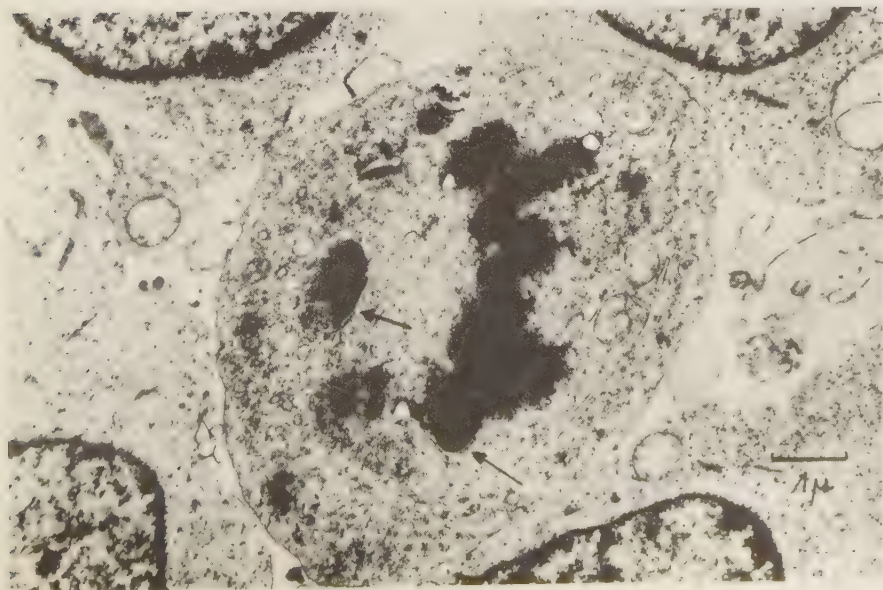
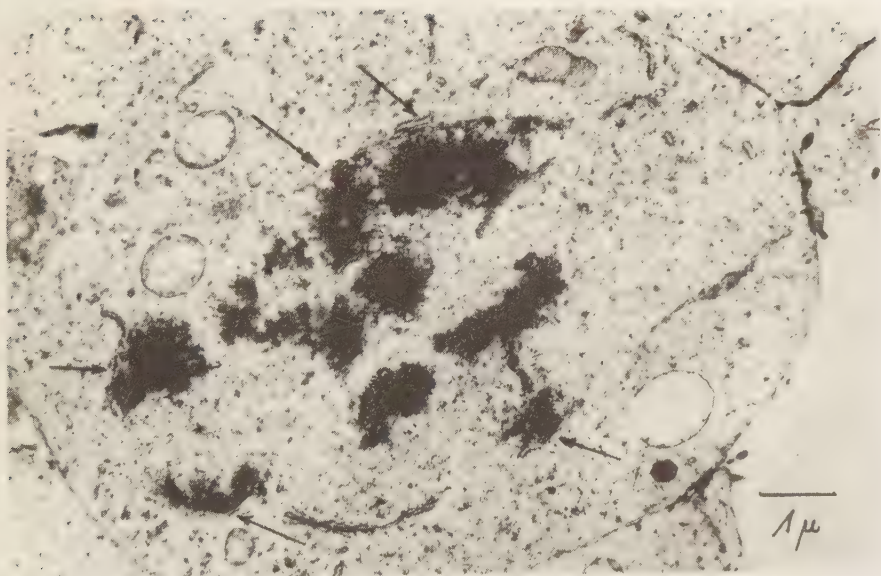


Abbildung 19

Rattendecidua, Tag 12 (nach 1,2 mg Methotrexat/kg KG am Tag 10)

Vergr. 1 : 16000

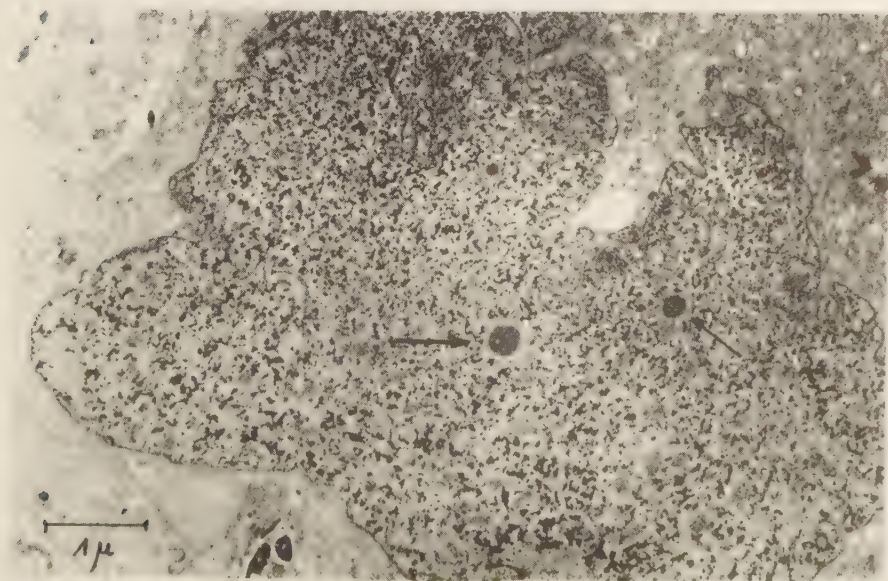
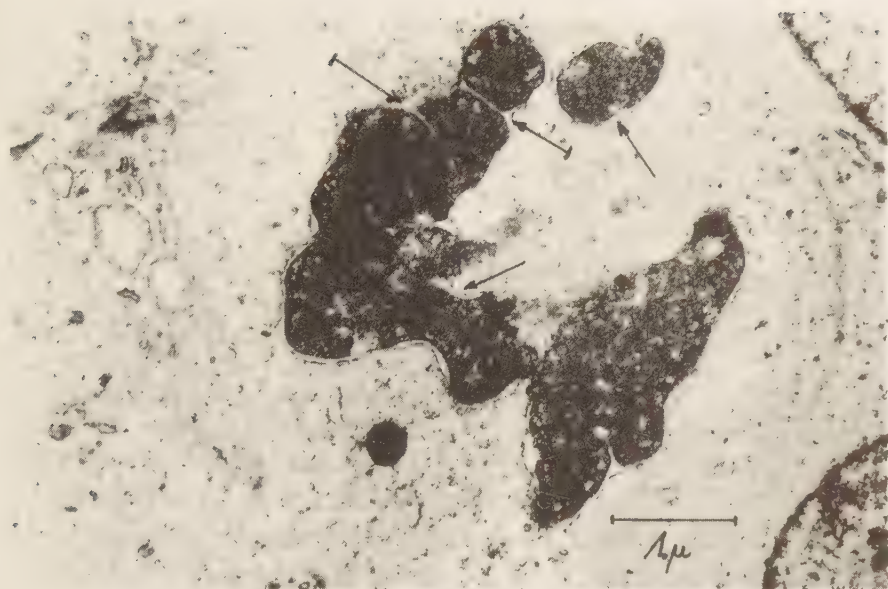
Telophase. Umhüllung des Chromatin-Materials mit Fragment- (←) und Kammerbildung (←|).

Abbildung 20.

Riesenzelle, Ratte Tag 12 (nach 1,2 mg Methotrexat/kg KG am Tag 10)

Vergr. 1 : 13000

Zellkern mit segregierten Nukleoli (◐) und zahlreichen kleinen verdickten Chromatinplaques.



Lebenslauf

Am 19. September 1938 wurde ich als Sohn des Tierarztes Richard Roetz und seiner Frau Meta, geb. Stottmeister, in Magdeburg geboren. Meine Kindheit verbrachte ich bis 1946 in Gardelegen, dann in Niendorf b. Oebisfelde. In Gardelegen, Niendorf-Bergfriede und Oebisfelde besuchte ich die dortigen Grundschulen, in Oebisfelde und Haldensleben die Oberschule, die ich 1956 mit gutem Abitur abschloß.

Da ich keine Zulassung zum Hochschulstudium erhielt, übersiedelte ich 1956 nach Westberlin und legte hier nach einem einjährigen Sonderlehrgang die Ergänzungsprüfung zur Reifeprüfung ab. 1957 wurde ich an der Freien Universität Berlin zum Medizinstudium zugelassen, bestand 1958 das Vorphytikum mit "gut", mußte dann nach vollständig absolviertem vorklinischen Programm wegen des nicht vorhandenen Kleinen Latinums 1962 dieses Studium endgültig aufgeben.

Mein 1962 begonnenes Studium der Biologie mußte ich, auch durch studienfremde Tätigkeiten, selbst finanzieren. Mehrere Jahre war ich beim "Chemischen Zentralblatt" bis zu dessen Auflösung Vertragsreferent für Biochemie. An den Instituten für Genetik und für Anthropologie sowie mehrere Jahre am Institut für Biochemie war ich als studentische bzw. wissenschaftliche Hilfskraft angestellt. 1970 habe ich in den Fächern Allgemeine Biologie und Genetik (Molekularbiologie), Biochemie und Anthropologie und mit einer Arbeit über "Zum Einfluß von Thalidomid auf larvales Wachstum und Metamorphose von *Xenopus laevis* (DAUDIN)" die Diplom-Hauptprüfung mit "sehr gut" bestanden.

Bis zu meiner Versetzung im Juni 1971 war ich als wissenschaftlicher Assistent am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, danach in der Gruppe Merker des Sonderforschungsbereichs 29 "Embryonale Entwicklung und Differenzierung (Embryonal-Pharmakologie)" der DFG an der Freien Universität Berlin tätig.

Seit 1960 bin ich mit Anny Mesch verheiratet. Mein Sohn wurde 1961 geboren.

DIFO-DRUCK SCHMACHT - BAMBERG RUF:62216